

**Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

Direktor: Prof. Dr. med. M. Schrappe

**Untersuchungen zur Funktion und Struktur
des Carboxyterminus der
3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ II**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**vorgelegt von
NELE WÜSTEMANN
aus Kiel**

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Riepe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Siniatchkin

Tag der mündlichen Prüfung: 2.Juni 210

Zum Druck genehmigt, Kiel den 2.Juni 2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Fragestellung.....	2
3. Grundlagen.....	3
3.1. Die 3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta 4$ - $\Delta 5$ -Isomerase	3
3.2. Physiologie und Pathophysiologie der Steroidhormone	4
3.2.1. Androgene	4
3.2.2. Störung der sexuellen Differenzierung.....	5
3.2.3. Aldosteron.....	6
3.2.4. Salzverlust	6
3.2.5. Cortisol.....	6
3.2.6. Hypocortisolismus.....	7
3.3. Diagnose und Therapie des 3 β -HSD-II-Mangels.....	7
4. Patienten, Material und Methoden.....	8
4.1. Patientendaten	8
4.1.1. Patient 1.....	8
4.1.2. Patient 2 und 3.....	8
4.2. Mutationsanalyse.....	9
4.2.1. DNA-Isolierung.....	9
4.2.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	9
4.2.3. Sequenzierung.....	10
4.3. Herstellung der rekombinanten 3 β -HSD-II-DNA.....	10
4.3.1. Mutagenese	10
4.3.2. Subklonierung in den pcDNA3-Vektor	12
4.3.3. Subklonierung in den pCMV-Vektor.....	13
4.4. <i>In vitro</i> Expressionsanalyse	13
4.4.1. Transiente Transfektion	13
4.4.2. Hormoninkubation.....	14
4.4.3. Dünnschichtchromatographie	15
4.4.4. Luziferasemessung.....	15
4.4.5. Statistische Auswertung.....	15

4.5.	Proteinanalyse	16
4.5.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration	16
4.5.2.	Western Blot	16
4.6.	Immunfluoreszenz	17
4.7.	Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR).....	18
4.7.1.	RNA-Extraktion	18
4.7.2.	cDNA-Synthese	19
4.7.3.	Relative Quantifizierung.....	19
4.7.4.	Statistische Auswertung.....	20
4.8.	3 D-Modell	20
5.	Ergebnisse	22
5.1.	Mutationsanalyse.....	22
5.2.	Expressionsanalyse.....	23
5.2.1.	Vergleich der Expressionsvektoren pcDNA3 und pCMV	23
5.2.2.	Umsatz von Pregnenolon zu Progesteron	23
5.2.3.	Umsatz von DHEA zu Androstendion	24
5.3.	Enzymkinetik	25
5.4.	Western Blot.....	26
5.5.	Intrazelluläre 3 β -HSD-II-Lokalisation.....	26
5.6.	qRT-PCR.....	27
5.7.	3D-Modell	28
6.	Diskussion	31
6.1.	Genotyp und Phänotyp bei c-terminalen Stoppmutanten der HSD3B2	31
6.2.	Funktionelle Charakterisierung der 3 β -HSD-II Mutanten.....	32
6.3.	Zusammenhänge von Struktur und Funktion.....	33
7.	Zusammenfassung.....	35
8.	Anhang.....	36
9.	Abbildungsverzeichnis.....	40
10.	Literaturverzeichnis	41
11.	Danksagung	45
12.	Lebenslauf.....	46

Abkürzungsverzeichnis

3 β -HSD	3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Isomerase	Δ^5 - Δ^4 -
AB	Applied Biosystems	
AS	Aminosäure	
BSA	Bovines Serumalbumin	
CDP-Star	Disodium 2-Chloro-5-Phenylphosphat-Star	
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase	
CMV	Cytomegalievirus	
Cp	Crossing Point	
c-terminal	carboxyterminal	
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol	
DHEA/ DHEA-S	Dehydroepiandrosteron/ DHEA-Sulfat	
DHT	Dihydrotestosteron	
DSD	Störung der sexuellen Differenzierung	
ER	endoplasmatisches Retikulum	
FCS	fetales Kälberserum	
LB	Lysogeny Broth	
NEB	New England Biolabs	
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung	
qRT-PCR	quantitative Echtzeit PCR	
SDR	Kurzketten-Dehydrogenase/ -Reduktase	
SV40	Simian-Vacuolating-Virus 40	
TBS	Tris-gepufferte Salzmischung	
TLC	Dünnschichtchromatographie	
WT	Wildtyp	

1. Einleitung

Der klassische 3 β -HSD-II-Mangel basiert auf einem genetischen Defekt des adrenalen und gonadalen Enzyms 3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase Typ II (3 β -HSD-II). Die autosomal-rezessiv vererbte Krankheit stellt eine seltene Form des adrenogenitalen Syndroms dar und wurde zum ersten Mal 1962 von Bongiovanni beschrieben. Der Enzymdefekt beeinträchtigt die Biosynthese sämtlicher Steroidhormone und führt zu einem Aufstau der nicht metabolisierten Stoffwechselprodukte. Diese Konstellation resultiert in einem klinischen Bild mit hoher phänotypischer Variabilität. Die ineffektive Bildung der Androgene wirkt sich auf die sexuelle Differenzierung des äußeren Genitale *in utero* aus. XY-Individuen präsentieren sich mit einer unzureichenden Virilisierung verschiedener Ausprägung von Hypospadie bis hin zum ambivalenten Genitale. Bei genetisch weiblichen Individuen sind keine pathologischen Veränderungen oder eine milde Klitorishypertrophie zu erkennen. In den ersten Lebenstagen führt der Mangel an Cortisol und Aldosteron zu einer Nebenniereninsuffizienz mit Salzverlust. Ferner besteht eine adrenale Hyperplasie aufgrund des gestörten negativen Feedback-Mechanismus von Cortisol (1-3).

Bis *dato* wurden auf der Welt ca. 50 Patienten mit einem 3 β -HSD-II-Mangel diagnostiziert, die homozygot, heterozygot oder compound heterozygot für Mutationen im *HSD3B2* Gen sind. Insgesamt wurden ca. 40 verschiedene Mutationen identifiziert, von denen die Mehrzahl Missense-Mutationen sind und sich vorrangig im proximalen Abschnitt des *HSD3B2* Gens lokalisieren. Innerhalb der carboxyterminal (c-terminal) gelegenen Region wurden bislang lediglich 4 natürliche Mutationen nachgewiesen (Y308X, 818delAA, P341L, Stop373C). *In vitro* durchgeführte Expressionsanalysen der mutanten Enzyme zeigten vielfach eine Proteininstabilität und einen Verlust der 3 β -HSD-II-Aktivität (4-9).

Untersuchungen des 3 β -HSD-II Proteins haben Aufschlüsse über bestimmte Funktionen desselben ergeben. So existieren Abschnitte für zwei Membranspannungsdomänen, für eine Cofaktor-Bindungsstelle sowie für die Dehydrogenase- und Isomerase-Aktivität innerhalb einer Substratbindungsstelle. Dem C-Terminus wurde bisher keine Funktion zugeschrieben und die Informationen beschränken sich bisweilen auf die Erkenntnis, dass der c-terminale Anteil des Enzyms auf der cytoplasmatischen Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert ist (10-14).

2. Fragestellung

Grundlage dieser Arbeit war die Untersuchung von drei Patienten mit dem klinischen Bild eines 3 β -HSD-II-Mangels. Folgende Fragen ergaben sich aus den klinischen Fällen bzw. aus den Ergebnissen der molekularbiologischen Analytik:

Können bei klinisch und hormonell eindeutiger Verdachtsdiagnose Mutationen im *HSD3B2* Gen der Patienten detektiert werden?

Welchen Einfluß haben die detektierten Mutationen auf die Funktion der 3 β -HSD-II?

Aus dem Befund weit distal gelegener Stoppmutanten bei den Patienten (R335X und W355X) ergaben sich die Fragen: In wie weit ist der c-Terminus für die Funktion der 3 β -HSD-II essentiell? Lassen sich funktionell wichtige Bereiche eingrenzen und was bedingt die Inaktivierung der Enzymfunktion bei c-terminaler Verkürzung des Proteins?

Abschließend sollte geklärt werden, ob eine Charakterisierung der dreidimensionalen Struktur des c-Terminus der 3 β -HSD-II Erklärungen für die *in vitro* beobachteten funktionellen Effekte liefern kann.

3. Grundlagen

3.1. Die 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 Isomerase

Die 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase ist essentiell für die Synthese aller aktiven Steroidhormone, da sie die Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron, von 17-OH-Pregnenolon zu 17-OH-Progesteron sowie von Dehydroepiandrosteron (DHEA) zu Androstendion katalysiert. Aus den Produkten werden über weitere enzymatische Schritte das Mineralocorticoid Aldosteron, das Glucocorticoid Cortisol und die Sexualhormone Testosteron und Östrogen gebildet (s. Abb. 1) (15).

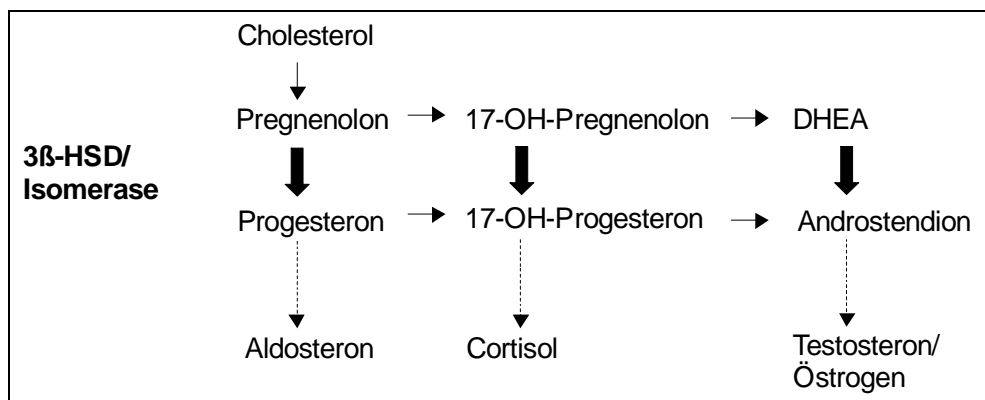


Abbildung 1: Ausschnitt der Steroidhormonbiosynthese mit den durch die 3 β -HSD katalysierten Schritten

Die Dehydrogenaseaktivität des Enzyms führt mit Hilfe des Cofaktors NAD^+ zu einer Oxidation der 3 β -Hydroxylgruppe der Δ^5 -Steroide (Pregnenolon, 17-OH-Pregnenolon, DHEA). Das Reduktionsprodukt NADH induziert eine Konformationsänderung des Enzyms und aktiviert dadurch die Isomerase, die die Doppelbindung von der Δ^5 - in die Δ^4 -Position verlagert (s. Abb. 2) (16-18).

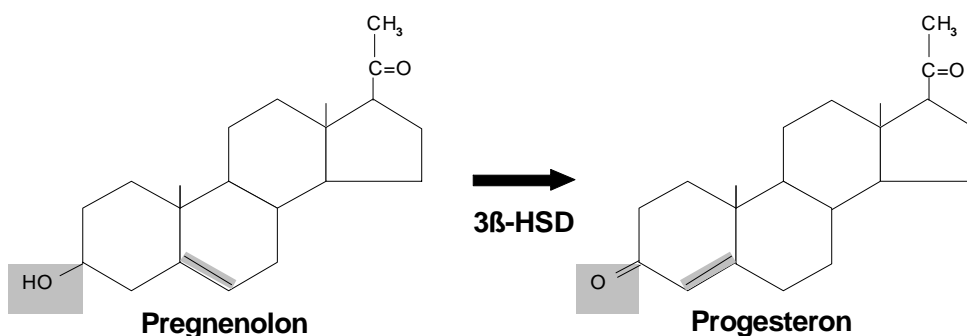


Abbildung 2: Enzymatische Reaktion der 3 β -HSD am Beispiel von Pregnenolon zu Progesteron

Die 3 β -HSD gehört in die Familie der Kurzketten-Dehydrogenasen/ -Reduktasen (SDR) (19). Von der 3 β -HSD existieren zwei Isoenzyme Typ I und Typ II (3 β -HSD-I, 3 β -HSD-II), deren Gene auf Chromosom 1p13.1 lokalisiert sind (20, 21). Diese Gene bestehen aus vier Exons und drei Introns und sind zu 93% homolog. Inklusive Methionin als erste Aminosäure (AS) zählt die 3 β -HSD-I 373 AS und die 3 β -HSD-II 372 AS. Typ I wird überwiegend in der Haut, Brustdrüse und Plazenta exprimiert. Typ II wird ausschließlich in der Nebenniere, im Hoden und in den Eierstöcken gebildet (22, 23). Es handelt sich um ein membrangebundenes Enzym, das in der Nebennierenrinde und im Ovar hauptsächlich im ER lokalisiert ist und in den Leydig-Zellen auf die Mitochondrien beschränkt ist (13, 24).

3.2. Physiologie und Pathophysiologie der Steroidhormone

3.2.1. Androgene

In der Zona reticularis der Nebennierenrinde werden die Präkursoren DHEA, DHEA-Sulfat (DHEA-S) und Androstendion synthetisiert und in das Plasma abgegeben. Nach Aufnahme in die Keimdrüsen werden aus den Vorstufen die aktiven Hormone Testosteron bzw. Östrogen gebildet (25). Unter Einfluss von Testosteron entwickeln sich beim Fetus die Wolff-Gänge zu den Epididymis, Vas deferens und Vesiculae seminales. Die Müller-Gänge bilden sich durch die Wirkung des in den Sertoli-Zellen gebildeten Anti-Müller-Hormons zurück. Die Ausbildung des äußeren männlichen Genitale ist abhängig von Dihydrotestosteron (DHT), das durch die 5 α -Reduktase aus Testosteron gebildet wird. DHT induziert die Verlängerung des Genitalhöckers zum Penis, die Fusion der Urethralfalten und Umschließung der Urethra des Penis sowie die Verschmelzung der Labioskrotalwülste zum Skrotum. In Abwesenheit von Testosteron und DHT kommt es zum Phänotyp eines weiblichen Geschlechtes. Die Wolff-Gänge bilden sich zurück und die Müller-Gänge differenzieren sich zu den Tuben, Uterus und Fornix vaginae. Der Genitalhöcker formiert sich zur Klitoris, die Urethralfalten bilden die Labia minora und die Labioskrotalfalten die Labia majora. In der 12. Embryonalwoche ist diese Entwicklung abgeschlossen (26, 27).

3.2.2. Störung der sexuellen Differenzierung

Ein Defekt der 3β -HSD-II führt zu einem Androgenmangel und infolgedessen zu einer Störung der sexuellen Differenzierung (DSD) *in utero*. Da die 3β -HSD-I Testosteron aus adrenalem Androstendion in geringen Konzentrationen herstellt und die männliche Gonade Anti-Müller-Hormon produziert, ist die Differenzierung des inneren Genitale nicht beeinflusst. Der 5α -Reduktase mangelt es jedoch an Substrat für die Bildung von DHT. Das Defizit an DHT führt bei genetisch männlichen Individuen zu einer unzureichenden Maskulinisierung des äußeren Genitale (46, XY DSD) (28). Das klinische Spektrum reicht vom normal erscheinenden männlichen Genitale mit Hypospadie über sämtliche Stufen der Ambivalenz bis zum weiblichen erscheinenden Phänotyp. Die Klassifikation erfolgt z.B. nach Sinnecker (s. Abb. 3). Die Hoden verbleiben häufig in inguinaler Position. Es kommt zur vollständigen Regression der Müller-Gänge (29).

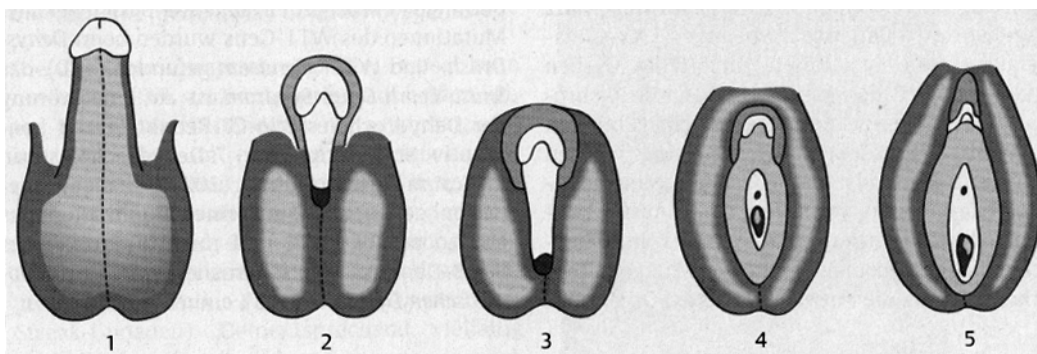


Abbildung 3: Klassifikation der Phänotypen bei Individuen mit 46, XY DSD nach Sinnecker; (1) männlich, gestörte Spermatogenese und/ oder gestörte Virilisierung in der Pubertät; (2) vorwiegend männlich, isolierte Hypospadie und/ oder Mikrophallus und höhergradige Hypospadie, bipartiertes Skrotum; (3) ambivalent, klitorisähnlicher Mikrophallus, labienähnliches bipartiertes Skrotum, perineoskrotale Hypospadie oder Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina; (4) vorwiegend weiblich, Klitorishypertrophie und/ oder labiale Fusion, Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina; (5) weiblich, keine Virilisierungszeichen präpuberal

Die Patienten mit weiblichem Karyotyp (46, XX) weisen häufig eine normale sexuelle Differenzierung oder geringe Virilisierungszeichen mit dezenter Klitorishypertrophie auf. Die Einteilung erfolgt nach Prader. Aufgrund der 3β -HSD-I-Aktivität wird ein Teil des in hoher Konzentration vorliegenden DHEA über Androstendion in Testosteron und DHT umgewandelt. Dieser Androgenüberschuss kann zu einer Maskulinisierung des weiblichen äußeren Genitale führen (30).

3.2.3. Aldosteron

Das wichtigste Mineralocorticoid Aldosteron wird in der äußeren Zona glomerulosa des adrenalen Cortexes gebildet und ist für den Elektrolyt- und Wasserhaushalt zuständig. Die Synthese wird hauptsächlich über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System reguliert. Eine intravaskuläre Volumenabnahme erhöht die Sekretion von Renin im juxtaglomerulären Apparat der Niere. Renin bewirkt die enzymatische Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I, welches durch das Angiotensin-Converting-Enzym wiederum zu Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II induziert in der Nebennierenrinde die Bildung von Aldosteron. Aldosteron wirkt am distalen Tubulus der Niere und führt zur Natriumrückresorption und Kaliumexkretion und damit zu einer intravasalen Volumenzunahme. Eine erhöhte Kaliumkonzentration im Blut induziert ebenfalls die Produktion von Aldosteron (31, 32).

3.2.4. Salzverlust

Bei der salzverlierenden Form des 3 β -HSD-II-Mangels kommt es in den ersten zwei Lebenswochen durch das Fehlen von Aldosteron zu Elektrolytstörungen mit Hyponatriämie und Hyperkaliämie. Folglich kommt es zu einer Abnahme des intravasalen Volumens und zur arteriellen Hypotonie. Unerkannt und unbehandelt führt der Salzverlust zu Kreislaufschock und Tod. In 30-40% der Fälle eines 3 β -HSD-II-Mangels fehlt aufgrund einer vorhandenen Restaktivität des Enzyms der Salzverlust, wodurch die Diagnose häufig verspätet gestellt wird (31).

3.2.5. Cortisol

Das Glucocorticoid Cortisol wird in einem zirkadianen und pulsatilen Rhythmus aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde ausgeschüttet. Es moduliert die Glukoneogenese und damit den Blutzuckerspiegel. Bei einer akuten Stressreaktion kommt es zu einer stark erhöhten Sekretion. Die Bildung wird über die Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Nebennieren-Achse gesteuert. Ein Anstieg des hypothalamischen Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) führt zu einer Steigerung des hypophysären adrenocorticotropen Hormons (ACTH). ACTH führt zu einer Hochregulation der adrenalen Cortisolsekretion und bewirkt längerfristig eine Organhyperplasie. Cortisol führt über eine Feed-back-Inhibition zur Hemmung der

CRH- und ACTH-Sekretion (33).

3.2.6. Hypocortisolismus

Ein Mangel an Glucocorticoid führt in den ersten Lebenswochen zu einer Addisonkrise mit Hypoglykämie, Gedeihstörung, Exsikkose und Erbrechen. Die geringe Cortisolkonzentration führt über den gestörten Feedback-Mechanismus zu einer kompensatorischen Erhöhung von ACTH, das eine kongenitale adrenale Hyperplasie und vermehrte Pigmentierung über den α MSH Anteil des Prohormons Proopiomelanocortin (POMC) bewirkt (32).

3.3. Diagnose und Therapie des 3 β -HSD-II-Mangels

Die Diagnose wird anhand der klinischen Symptome, den Laborparametern und der DNA-Mutationsanalyse gestellt. Da die Δ^5 -Steroide im Plasma erhöht sind, sehen die aktuellen Empfehlungen die Bestimmung der 17-OH-Pregnenolon-Konzentration vor, die typischerweise 100nmol/l überschreitet (Normwert für Neugeborene <40nmol/l). Ein nachfolgender ACTH-Stimulationstest dient in grenzwertigen Fällen zur Feststellung einer Nebenniereninsuffizienz (27, 34). Zusätzlich ist das Verhältnis von Δ^5 -Steroiden zu Δ^4 -Steroiden (Progesteron, 17-OH-Progesteron und Androstendion) im Plasma oder im Urin ein guter biochemischer Parameter (35). Da die 3 β -HSD-I aktiv ist, kann beim Neugeborenenenscreening 17-OH-Progesteron erhöht sein und den Verdacht fälschlicherweise auf einen 21-Hydroxylasemangel lenken.

Die Behandlung besteht in einer Substitution der Steroide mit Hydrocortison und Fludrocortison, um einer Addisonkrise vorzubeugen und den lebensbedrohlichen Salzverlust zu verhindern. Östrogene bzw. Testosteron werden ab Beginn der Pubertät substituiert. Das äußere Genitale bedarf häufig einer operativen Korrektur. Momentan erscheint eine solche innerhalb des ersten Lebensjahres erfolgreicher zu sein. Die Entscheidung zur Operation bedarf einer eingehenden Beratung im Team von Endokrinologen, Operateuren, Eltern und ggf. Patienten (36).

4. Patienten, Material und Methoden

4.1. Patientendaten

4.1.1. Patient 1

Das Neugeborene blutsverwandter Eltern hatte einen kleinen Penis (Länge 2cm) mit perinealer Hypospadie und ein bipartiertes Skrotum mit palpablen Testikeln (Sinnecker Stadium II, s. Kap. 3.2.2 Abb.3). Blutuntersuchungen am ersten Lebenstag zeigten eine Hyponatriämie (127 mmol/l, Altersnorm 135-148 mmol/l), eine leichte Hyperkaliämie (5.9 mmol/l, Altersnorm 3.6-5.8 mmol/l) und einen männlichen Karyotyp (46, XY). In der Sonographie konnten keine Müller-Derivate dargestellt werden. Am dritten Lebenstag erfolgte ein ACTH-Stimulationstest, der mit einem geringen Anstieg von Cortisol die Nebenniereninsuffizienz bestätigte (200 nmol/L nach ACTH, normal >550 nmol/l). Es wurden stark erhöhte DHEA-S Werte gemessen (5000 nmol/l, Referenzwert <2000 nmol/l). Im 24-Stunden-Sammelurin wurden über der Norm liegend Werte für DHEA bestimmt (154 µmol/Tag, normal <26 µmol/Tag). 17-OH-Pregnenolon wurde nicht bestimmt. Die Diagnose wurde anhand des klinischen Untersuchungsbefundes, des beschriebenen Hormonstatus und der molekulargenetischen Analyse gestellt. Eine Therapie mit Hydrocortison und Fludrocortison in Verbindung mit Natriumchlorid wurde eingeleitet.

4.1.2. Patient 2 und 3

Die Patienten sind Geschwister. Die Eltern sind blutsverwandt, zeigen aber keine klinischen Symptome.

Bei dem ersten Jungen fielen neonatal ein Mikrophallus mit skrotaler Hypospadie und ein Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina auf (Sinnecker Stadium III, s. Kap. 3.2.2 Abb.3). Inguinal waren die Hoden beidseits tastbar. Erste Blutuntersuchungen zeigten eine Hyponatriämie (128 mmol/l, Altersnorm 135-148 mmol/l), eine leichte Hyperkaliämie (6.1 mmol/l, Altersnorm 3.6-5.8 mmol/l) und einen männlichen Karyotyp (46, XY). Im Neugeborenen-Screening fielen deutlich erhöhte 17-OH-Progesteron-Werte auf (342 nmol/l, normal <40 nmol/l). Detaillierte Hormonanalysen ergaben von der Norm abweichende Werte für 17-OH-Pregnenolon (130 nmol/l, normal <40 nmol/l), DHEA (242 nmol/l, normal <34 nmol/l) und DHEA-S (2950 nmol/l, normal <1000 nmol/l). Cortisol lag im Normbereich (56 nmol/l, normal

>25 nmol/l). Die Substitutionstherapie mit Hydrocortison und Fludrocortison wurde eingeleitet. Im Alter von 15 Monaten wurden die genitalen Fehlbildungen chirurgisch korrigiert.

Der jüngere Bruder zeigte einen Mikrophallus mit perineoskrotaler Hypospadie und Maldescensus testis (Sinnecker Stadium II). Der 17-OH-Progesteron-Wert war erhöht (407 nmol/l, normal <40 nmol/l). Da die Wahrscheinlichkeit groß war, dass er an einem 3 β -HSD-II-Mangel leiden würde, wurden keine weiteren Hormonanalysen in der Neugeborenenperiode erhoben. Die Substitution mit Hydrocortison und Fludrocortison wurde begonnen, als eine Hyponatriämie (130 mmol/l, Altersnorm 135-148 mmol/l) und Hyperkaliämie (7.0 mmol/l, Altersnorm 3.6-5.8 mmol/l) am zehnten Lebenstag auftraten. Die Diagnose wurde molekulargenetisch bestätigt. Mit 16 Monaten erfolgte eine Korrektur-Operation des Genitalbefundes.

4.2. Mutationsanalyse

4.2.1. DNA-Isolierung

Sämtliches zur molekulargenetischen Untersuchung zur Verfügung gestelltes Material wurde nach ausführlicher Aufklärung und Einwilligung der Eltern im Rahmen der klinischen Diagnostik entnommen. Die DNA aus dem EDTA-Blut wurde unter Verwendung des Wizard Genomic Purification Kit® (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben gewonnen. Nacheinander wurden Erythrozyten und Leukozyten lysiert, die zellulären Proteine mit Salz ausgefällt und danach die genomische DNA mit Isopropanol präzipitiert. Die DNA wurde gereinigt und mit DNA-Rehydrationslösung eluiert.

4.2.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation des *HSD3B2* Gens mit den vier Exons und der Exon-Intron-Übergänge wurden die PCR-Primer (s. Tabelle 1 im Anhang) bei Eurogentec (Seraing, Belgien) bestellt (37). Die PCR wurde mit der Hotstart-Methode durchgeführt, mit Hilfe derer die Reagenzien erst nach der initialen Erwärmung miteinander in Kontakt traten. Der untere Ansatz enthielt 10.8 μ l A.bidest, 12 μ l XXL Puffer, 8 μ l d’NTPs, 4.4 μ l Mg(Ac)₂ und 4.8 μ l Primer-Mix (20pmol/ μ l). Der obere Ansatz setzte sich aus 18.5 μ l XXL Puffer und 1.5 μ l Amplitaq® DNA-Polymerase

zusammen. Die Ansätze waren durch Ampliwax[®] PCR Gem 100 getrennt. Die Reagenzien wurden von Applied Biosystems bezogen (AB, Foster City, USA). Die PCR-Bedingungen bestanden aus jeweils einer Minute Denaturierung bei 95°C, Hybridisierung bei 55°C für Exon 1, 2 und 4 bzw. 51 °C für Exon 3 und Extension bei 70°C für 34 Zyklen. Die PCR-Produkte wurden über eine Säule mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Dtl.) aufgereinigt.

4.2.3. Sequenzierung

Um die Lokalisation der Mutationen im *HSD3B2* Gen ausfindig zu machen, wurden die PCR-Produkte sequenziert. Es handelt sich dabei um das modifizierte Verfahren von Sanger, bei dem während einer PCR mit Hilfe der AmpliTaq-DNA-Polymerase fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide eingebaut werden und dies zu einem Kettenabbruch führt (38). Der Kapillarsequenzierer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, AB, Darmstadt, Dtl.) trennt die unterschiedlich langen Fragmente elektrophoretisch auf und detektiert die verschiedenen Fluoreszenzsignale der Basen mithilfe eines Argonlasers. Die Basenabfolge konnte mit der SeqScape 3.7 Software (Perkin-Elmer, Wellesley, USA) analysiert werden.

Pro Ansatz wurden 1µg Template, 4.5µl Big Dye Cycle Sequencing Ready Mix und 1xPuffer (AB, Darmstadt, Dtl.) sowie 3.5µl eines 10pmol/µl verdünnten Primergemisches (PCR- und den 3-BETA-7S -Primern, Eurogentec, s. Tabelle 2 im Anhang) gemischt und mit Chill-Out 14TM Liquid Wax (Bio-Rad Laboratories, München, Dtl.) verschlossen. Das Cycle Sequencing Programm bestand aus einer Denaturierung bei 95°C für 30 Sek., Hybridisierung für 30 Sek. und Elongation bei 60°C für 4 Minuten für 34 Zyklen. Danach wurden die Proben über Micro Spin Säulen (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) aufgereinigt. 13µl des Eluats wurden mit 18µl Hi-DiTM Formamide (AB, Foster City, USA) versetzt und für zwei Minuten bei 95°C denaturiert. Nach einer einminütigen Zentrifugation erfolgte die automatische Sequenzierung.

4.3. Herstellung der rekombinanten 3β-HSD-II-DNA

4.3.1. Mutagenese

Die gezielte Mutagenese ist eine PCR-basierte Methode, bei der so genannte

Mutageneseprimer die gewünschte Mutation tragen und diese bei der Amplifikation der Ursprungs-DNA in das Gen einbauen.

Als Ausgangsprodukt diente ein pcDNA3-*HSD3B2*-Konstrukt (Prof. Simard, Cancer Genomics Laboratory, Quebec, Canada). Bei dem pcDNA3-Vektor handelt es sich um ein 5.4kb langes Plasmid, dessen Expression konstitutiv über einen Cytomegalievirus(CMV)-Promoter reguliert wird und das ein Resistenzgen für Ampicillin trägt. Die Mutageneseprimer wurden individuell konstruiert, so dass sie den gefundenen Mutationen entsprachen bzw. vorzeitige Stopp-Codons zur Untersuchung des c-terminalen Endes eingebaut waren (Q372X, K370X, K368X, H363X, R362X, D361X, V360X, L359X, S358X, W355X, R335X; s. Tabelle 3 im Anhang) (Metabion, Martinsried, Dtl.). Unter Verwendung des QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) mit der Pfu Turbo® DNA-Polymerase wurden die Mutationen in das *HSD3B2* Gen eingebracht. Das Protokoll des Herstellers wurde befolgt. Nach der Amplifikation wurde das Restriktionsenzym Dpn I (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) hinzugefügt, um die methylierten, nicht mutierten ursprünglichen DNA-Stränge zu verdauen.

Als Nächstes folgte die Transformation der Mutageneseprodukte in XL10-Gold® Ultracompetent Cells (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Diese Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit β -Mercaptoethanol vorbehandelt, damit sie das Plasmid besser aufnehmen. Nach kurzer Hitzeeinwirkung und Zugabe von NZY⁺-Medium wurde das Gemisch auf Carbenicillin-Agarplatten, ein Derivat des Ampicillins, ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nur Bakterien, die das Mutageneseprodukt aufgenommen und somit die Antibiotikaresistenz erworben hatten, konnten wachsen. Die Transformationsbedingungen wurden dem Herstellerprotokoll entnommen (Herstellung der Medien und der Agarplatten s. Tabelle 4 im Anhang).

Von den Agarplatten wurden einzelne Kolonien gepickt und in LB/ Carbenicillin-Medium (Lysogeny Broth) erneut kultiviert. Für die Präparation der rekombinanten DNA aus den Zellkulturen wurde das NucleoSpin® Plasmid-Kit (Machery-Nagel, Düren, Dtl.) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Lysisbuffer freigesetzt und an eine Anionenaustauschermembran gebunden. Nach diversen Waschschritten wurde die DNA mit A.bidest eluiert. Die DNA-Konzentration wurde bei einer 1:80-Verdünnung mit A.bidest photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Um den Einbau der gewünschten Mutation zu bestätigen wurde die DNA mit den Primern 576S, 678 rev., T7 fwd. und Sp6 rev. sequenziert (s. Tabelle 2 im Anhang)

und analysiert (s. Kap. 4.2.3).

4.3.2. Subklonierung in den pcDNA3-Vektor

Aus der Plasmid-DNA wurde das verkürzte *HSD3B2* Gen mithilfe von Restriktionsenzymen herausgeschnitten und erneut mit einem ebenso geschnittenen pcDNA3-Vektor ligiert, um die Unversehrtheit des Expressionsvektors zu sichern.

1µg Template wurde mit 1µl Eco R1, 2µl Puffer H und 2µl 1%igem BSA (bovines Serumalbumin) gemischt und mit A.bidest auf ein Volumen von 20µl aufgefüllt. Nach Verschluss mit Flüssigwachs erfolgte der Verdau bei 37°C für zwei Stunden. Danach wurden 1.5µl Xba, 3µl Puffer D und 5.5µl A.bidest zugefügt. Die Restriktion wurde bei gleicher Temperatur für vier Stunden fortgesetzt. Von dem Vektor wurde die zehnfache Menge verdaut. Die Reagenzien wurden von Promega bezogen (Promega, Madison, USA).

Die aus dem Verdau gewonnenen Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Banden ausgestanzt und die DNA mit dem EasyPure DNA Purification Kit (Biozym, Hess.Oldendorf, Dtl.) aufgereinigt.

Von dem Vektor wurden 40µl mit 3.5µl CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), 5µl CIAP 10xReaktionspuffer und 1.5µl A.bidest gemischt und für eine Stunde bei 37°C dephosphoryliert, um eine direkte zirkuläre Religation zu verhindern. Die Reaktion wurde mit 10µl CIAP-Stopp-Puffer beendet (alle Reagenzien von Promega, Madison, USA). Der Vektor wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Dtl.) über eine Säule aufgereinigt.

Die Menge der Restriktionsprodukte wurde im Vergleich zu einem Größenstandard (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, Carlsbad, USA) auf einem Gel abgeschätzt, damit ein *HSD3B2*/ pcDNA3-Verhältnis von ~2:1 für die Ligation bestimmt werden konnte. Pro Ansatz wurden je 1µl T4 Ligase (4U/µl), 10xLigasepuffer sowie rATP (Stratagene, LaJolla, USA) und die entsprechenden Mengen an Insert und pcDNA3 eingesetzt. Das Volumen wurde mit A.bidest auf 10µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte bei 4°C über Nacht.

Die Ligationsprodukte wurden transformiert, Klone gezüchtet und die rekombinante DNA extrahiert (s. Kap. 4.3.1). Vor der Extraktion wurden Glycerolkulturen hergestellt, indem 400µl der Zellkultur mit 100µl eines 50%igen Glycerol/ H₂O-Gemisches (Sigma-Aldrich Chemie, München, Dtl.) vermennt und bei -80°C gelagert wurden. Hieraus konnten nach erfolgreicher Sequenzierung die pcDNA3-Insert-

Konstrukte in größeren Mengen unter Verwendung des EndoFree Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden, Dtl.) für die Transfektionen hergestellt werden.

4.3.3. Subklonierung in den pCMV-Vektor

Der pCMV-3Tag-2B Expressionsvektor (Stratagene, LaJolla, USA) ist am n-terminalen Ende mit einem c-myc Epitop (10 AS, EQKLISEEDL) in dreifacher Ausführung markiert, welches durch einen Anti-c-myc Antikörper detektiert werden kann (s. Western Blot Kap. 4.5.2). Der pCMV-Vektor ist 4.2kb lang, wird konstitutiv über den CMV-Promoter exprimiert und trägt Resistenzgene für Kanamycin sowie Neomycin (s. Kap. 4.7).

Von den pcDNA3/ *HSD3B2*-Produkten wurden jeweils 1µg mit 1µl Xho I und 1,5µl Msc I verdaut. Der Restriktion wurden noch 5µl Puffer 3, 2µl 1%iges BSA und A.bidest beigegeben, so dass die Summe 30µl ergab. Von dem Vektor wurden 5µg mit jeweils 5µl Eco RV, Xho I, Puffer 3 und 1%iges BSA sowie 25µl A.bidest verdaut. Nach Zugabe von Flüssigwachs erfolgte die Restriktion für vier Stunden bei 37°C. Die verwendeten Reagenzien stammten von New England Biolabs (NEB, Ipswich, USA).

Die folgenden Schritte waren denen nach der zuvor beschriebenen Restriktion (s. Kap. 4.3.2) gleich. Mit Ausnahme von: 1. Die Ligation wurde in einem Verhältnis Insert zu Vektor von ~3:1 durchgeführt. 2. Das Transformationsprodukt wurde auf Kanamycinagar kultiviert und die Klone in LB/ Kanamycin-Medium gezüchtet (Herstellung s. Tab.4 im Anhang). 3. Um die Sequenz zu bestätigen wurden die Proben mit dem T3 rev.- und T7 fwd.-Primer amplifiziert (s. Tabelle 2 im Anhang).

4.4. *In vitro* Expressionsanalyse

4.4.1. Transiente Transfektion

Cos-7 Zellen stammen aus einer fibroblastenähnlichen Zelllinie, die aus der Niere der Grünen Meerkatze gewonnen wurde. Die Zellen wurden stabil mit einer Mutante des Simian-Vacuolating-Virus (SV40) transfiziert und somit immortalisiert. Sie wurden stets in Nährmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten (Herstellung s. Tabelle 5 im Anhang).

Am ersten Tag wurde das Nährmedium entfernt, die Zellen mit 1xPBS (Phosphat

gepufferte Salzlösung, PAA Laboratories, Cölbe, Dtl.) gewaschen und mit Trypsin gelöst. 250.000 Zellen wurden pro einzelnes 6-Well ausgesät, mit 2ml Nährmedium bedeckt und bebrütet. Für jede Mutante und den Wildtyp (WT) wurden pro Hormon und Hormonkonzentration drei Wells ausgesät. Der Leervektor (pcDNA3) wurde bei einer Hormonkonzentration dreifach bestimmt.

Am zweiten Tag erfolgte die zeitweilige Einbringung der *HSD3B2*-Plasmide in die Zellen. Als Stock A wurden 375µl Transfektionsmedium mit 25ng pRK-TK (Promega, Madison, USA) angesetzt, in einem Stock B 375µl Transfektionsmedium mit 6µl LipofectamineTM Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.). Lipofektamin dient zur Einbringung der Fremd-DNA in die Zellen. pRK-TK wird ebenfalls in die Zellen transfiziert und kodiert für die Renillaluziferase, die zur Überwachung der Transfektionseffizienz genutzt wird (s. Kap. 4.4.4). 1000ng Plasmid-DNA wurden Stock A hinzugefügt und zusätzlich 375µl von Stock B. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Volumen wurde mit Transfektionsmedium verdoppelt und von dem Gemisch 1.5ml auf die Zellen gegeben. Nach fünf Stunden wurde der Transfektionsmix entfernt und die Zellen mit 2ml Nährmedium bedeckt.

Am dritten Tag wurde das Nährmedium gewechselt.

4.4.2. Hormoninkubation

Am vierten Tag wurde die 3β-HSD-II-Aktivität der Zellen für den Umsatz von DHEA zu Androstendion und von Pregnenolon zu Progesteron gemessen. Das Inkubationsmedium enthielt 10pmol/ml NAD⁺ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.), 0.25µCi tritiummarkiertes Hormon (Perkin Elmer, Boston, USA) und 1µmol/l ‚kaltes‘ Hormon (Pregnenolon und DHEA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.) sowie Transfektionsmedium. Mit 1ml wurden die Zellen 2¼ Stunden für Pregnenolon bzw. 3½ Stunden für DHEA inkubiert. Das Medium wurde in 5ml Dichlormethan (Merck, Darmstadt, Dtl.) aufgenommen. Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und mit 200µl 1xLysispuffer (Promega, Mannheim, Dtl.) lysiert.

Für die Mutanten mit Restaktivität (Q372X, K370X, K368X, H363X, R362X, D361X; s. Kap. 5.2) und den WT wurde eine Kinetik mit unterschiedlichen Konzentrationen an nicht radioaktivmarkiertem DHEA durchgeführt: 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 und 4µmol/L. Die oben beschriebenen Bedingungen waren identisch.

4.4.3. Dünnschichtchromatographie

Die Steroide wurden durch zweiminütiges Schütteln aus dem Medium in Dichlormethan überführt. Der Überstand wurde abgenommen und das Dichlormethan mit Stickstoff eingedampft. Die Hormone wurden in 100%igem Ethanol gelöst und auf Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-Platten (TLC-Platten, Merck, Darmstadt, Dtl.) aufgetragen. Es folgte die chromatographische Trennung der Proben in einem Gemisch von Toluol und Aceton von 4:1 (Merck, Darmstadt, Dtl.).

Die Radioaktivität auf den Platten wurde mit dem Rita Star TLC-Scanner und der Steuerungssoftware Rita Controll Version 1.24 gemessen und mit der Rita TLC Analysis Software Version 1.97 die Peaks von Pregnenolon und Progesteron bzw. DHEA und Androstendion ausgewertet (Raytest, Straubenhardt, Dtl.).

4.4.4. Luziferasemessung

Das Enzym Renillaluziferase ist das Translationsprodukt des pRK-TK Expressionsvektors und katalysiert die Oxidation von Coelenterazine. Diese Reaktion erzeugt Licht, dessen Intensität gemessen wird. Die Cotransfektion des Vektors ermöglicht die Transfektionseffizienz des Zielgens zu normieren.

Die Renillaluziferase-Aktivität von 20µl lysierten Zellen wurde mit 100µl Renilla Luciferase Assay Reagenz (Promega, Madison, USA) für 10 Sekunden im Luminometer (veritas microplate luminometer TurnerBiosystems, Sunnyvale, USA) gemessen und mit der Veritas-Software (Version 1.2.0) berechnet.

4.4.5. Statistische Auswertung

Die 3β-HSD-II-Aktivität wurde rechnerisch erstellt als Umsatz des Hormons in pmol pro Well pro Minute. Von dem Ergebnis wurde die 3β-HSD-II Aktivität von Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, substrahiert. Für die Ermittlung der enzymatischen Kenngrößen wurden die 3β-HSD-II-Aktivitäten für die unterschiedlichen Hormonkonzentrationen (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 und 4µmol/L) berechnet und mittels GraphPad Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) die Michaelis-Menten-Konstante (K_M -Wert) und die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit (V_{max} -Wert) bestimmt.

Um für die Versuche die Plasmide mit dem pCMV-Vektor nutzen zu können, musste die Expression des WT gekoppelt an den pCMV-Vektor bzw. an den pcDNA3-Vektor

miteinander verglichen werden. Dafür wurde der Mann-Whitney Rang Summen Test verwendet.

Die Enzymaktivitäten aller Mutanten und des WT wurden bei einer DHEA-Konzentration von $0.5\mu\text{mol/l}$ und einer Pregnenolon-Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ bestimmt. Die Mittelwerte der 3β -HSD-II-Aktivitäten wurden nach initialem ANOVA im Bonferroni-Test untereinander auf signifikante Unterschiede geprüft.

Die K_M -Medianwerte und die zugehörigen V_{max} -Daten der Mutanten mit Restaktivität (Q372X, K370X, K368X, H363X, R362X und D361X) und des WT wurden je nach Ergebnis einer Prüfung auf Normalverteilung auf signifikante Unterschiede mit den Testverfahren nach Kruskal-Wallis und ggf. mit dem Student-Newman-Keuls Test als post hoc Verfahren untersucht.

4.5. Proteinanalyse

4.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die quantitative Bestimmung der Proteine aus den transfizierten Cos-7 Zellen wurde die Bradford-Methode genutzt. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau (Pierce, Rockford, USA) bildet mit den Proteinen Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 595nm haben.

Die Transfektionsprodukte wurden 1:10 verdünnt und hiervon $10\mu\text{l}$ mit $350\mu\text{l}$ Coomassie und $340\mu\text{l}$ A.bidest gemischt und für 6 Minuten inkubiert. Mit einem Photometer wurden nach Abgleich mit einer Blankprobe die Konzentrationen der Proben gemessen.

4.5.2. Western Blot

Der Western Blot diente dem spezifischen Nachweis der Expression und Translation der mutierten 3β -HSD-II-Enzyme.

Von den Gesamtproteinen wurden $10\mu\text{g}$ in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Dtl.) transferiert. Die Reagenzien, die Kammer und das Protokoll stammten von Invitrogen (Carlsbad, USA). Mit Ponceau (Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.) wurden die Membranen für 15 Minuten inkubiert, um die Proteine zu färben. Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei 4°C mit Blockierungspuffer, der

15%ige Milchlösung (Carl Roth, Karlsruhe, Dtl.) und 0.1% Tween 20 (Merck, Darmstadt, Dtl.) in 1xTBS (Tris-gepufferte Salzmischung, Herstellung s. Tabelle 6 im Anhang) enthielt. Der primäre Antikörper wurde 1:500 mit Blockierungspuffer verdünnt und die Membran damit 2 Stunden überschichtet. Es handelte sich um den Anti-c-myc Antikörper (Stratagene, LaJolla, USA), der sich gegen das c-myc Epitop des pCMV-Vektors und die damit konjugierten 3 β -HSD-II-Enzyme richtete. Nach drei 15 minütigen Waschgängen mit 1xTBS mit 0.1% Tween 20 erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti Mouse für IgG (Fc) AP conjugate 1 μ g/ μ l, Promega, Madison, USA) für eine Stunde. Dieser war 1:5000 mit Blockierungspuffer verdünnt. Er bindet an den Fc-Teil des primären Antikörpers und ist mit der alkalischen Phosphatase konjugiert. Die Waschschrte wurden wiederholt. Die Membran wurde 10 Minuten im Detektionspuffer (s. Tab. 6 im Anhang) geschwenkt und anschließend 5 Minuten mit CDP-Star (Disodium 2-Chloro-5-Phenylphosphat) inkubiert. CDP-Star ist Substrat der alkalischen Phosphatase, dessen Produkt Licht erzeugt. Die Lichtemission wurde zur Belichtung eines Röntgenfilms (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Österreich) benutzt.

4.6. Immunfluoreszenz

Diese Methode wurde angewendet, um die intrazelluläre Lokalisation der mutierten 3 β -HSD-II zu bestimmen. Als primäre Antikörper wurden der Anti-c-myc (s. Kap. 4.5.2) und der Anti-Calnexin Antikörper verwendet (Biomol, Hamburg, Dtl.). Letzterer richtet sich gegen Proteine des ER. Als sekundäre Antikörper wurden der rot fluoreszierende anti-Maus Alexa Fluor 594 Antikörper und der grün fluoreszierende anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 Antikörper (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) eingesetzt, die an den Anti-c-myc bzw. den Anti-Calnexin Antikörper binden.

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit 3%iger Formalin/ 1xPBS-Lösung für 20 Minuten fixiert. Danach folgte die Permeabilisierung der Zellen mittels 1%iger Triton X-100/1xPBS-Lösung für 5 Minuten. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte in einer 1:200 Verdünnung mit 1xPBS für 45 Minuten und nachfolgend mit den sekundären Antikörpern in einer 1:500 Verdünnung für die gleiche Zeit. Die Deckgläschen wurden mit Vectashield Haftungsmedium (Vector Laboratories, Burlingame, USA) auf einem Objektträger befestigt. Das Medium enthält 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI),

welches ein selektiver Fluoreszenzfarbstoff für DNA ist und so den Zellkern blau markiert.

Unter einem Mikroskop konnte von den Zellen der Nukleus bei 460nm, die Lokalisation der 3 β -HSD-II bei 594nm und die Lage des endoplasmatischen Retikulums bei 488nm dargestellt werden. Die Bilder wurden mit Adobe Photoshop CS3 (Adobe, Delaware, USA) übereinander projiziert.

4.7. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Bei der „Echtzeit“-PCR wird am Ende eines PCR-Zyklus die DNA-Menge quantifiziert, indem der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green, der sich in doppelsträngige DNA einlagert, bei 521nm detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zu der Menge an PCR-Produkt.

Die relative Quantifizierung stellt das Verhältnis von mRNA eines Target-Gens zur mRNA eines Referenz-Gens dar. Das Target-Gen war das 3 β -HSD-II-Gen und als Referenzgen fungierte das Resistenzgen Neomycin des pCMV-Vektors. Die in cDNA umgeschriebene RNA aus den transfizierten Zellen wird in die qRT-PCR eingesetzt. Zur Berechnung werden die Crossing Points (Cp) verwendet, die den Zyklus beschreiben, ab dem das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt. Der Cp der 3 β -HSD-II wird in Relation zu dem Cp von Neomycin gesetzt. Alle Proben innerhalb eines Laufes und zwischen mehreren Läufen werden mit einem Calibrator normiert, der eine positive Vergleichsprobe mit einem stabilen Verhältnis von Target- zu Referenz-Gen ist. Zusätzlich findet eine PCR-Effizienzkorrektur mithilfe von relativen Standards statt. Hierbei handelt es sich um Verdünnungsreihen von Target- und Referenz-Gen bekannter Konzentrationen. Das Ergebnis ist eine calibrator-normierte relative Quantifizierung mit Effizienzkorrektur.

4.7.1. RNA-Extraktion

Am ersten Tag wurden 250.000 Cos-7 Zellen pro Well ausgesät, die am zweiten Tag mit 100ng Template transfiziert wurden (s. Kap. 4.4.1). Für jede Mutante, den WT und den Leervektor wurde eine Dreifachbestimmung angesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 1xPBS abgeschabt und geerntet. Die Zellen wurden bei 6°C und 200rpm für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das

Pellet wurde in 1ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.) gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Zellen zu lysieren. Dann wurden 200µl Chloroform (Merck, Darmstadt, Dtl.) dazu gegeben und für 3 Minuten intermittierend gemischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit gleicher Temperatur- und Zeiteinstellung bei 12000rpm. Der Überstand wurde abpipettiert und mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Dtl.) die RNA weiter präpariert. Nach Fällung der RNA in Ethanol wurde sie an eine Austauschermembran gebunden, dann gewaschen und schließlich eluiert. Um Überreste von DNA zu vernichten, wurde die RNA mit DNase aus dem DNA-free Kit (Ambion, Austin, USA) behandelt.

Für die RNA-Konzentrationsmessung wurde der RNA Nano LabChip[®] Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Dtl.) verwendet. Dieser beinhaltet den Chip für die Messung und die Reagenzien sowie ein Protokollheft, nach dessen Anleitung die Messung durchgeführt wurde. Der RNA 600 Standard musste separat bezogen werden (Agilent Technologies, Waldbronn, Dtl.). Der Agilent 2100 Bioanalyzer und die 2100 Expert Software ermittelten die RNA-Konzentration. Das Messprinzip beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung der RNA nach ihrer Größe und dem Abgleich mit dem Standard.

4.7.2. cDNA-Synthese

Die reverse Transkriptase ist ein Enzym der Retroviren und nutzt einen RNA-Einzelstrang als Matritze für die Synthese von cDNA. Nach diesem Prinzip funktioniert das RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Dtl.). Es wurden 1000ng RNA eingesetzt und der Random Hexamer Primer verwendet. Alles Weitere erfolgte nach Protokoll.

4.7.3. Relative Quantifizierung

Grundsätzlich wurde eine cDNA viermal amplifiziert und quantifiziert. Es handelt sich um eine Doppelbestimmung für die 3β-HSD-II-cDNA sowie für die Neomycin-cDNA. In eine Kapillare wurden 10µl 2xQuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Dtl.), 2µl Primermix der 3β-HSD-II- oder der Neomycin-Primer (100pmol/µl; Primer s. Tabelle 7 im Anhang), 6µl A.bidest und 2µl cDNA gefüllt. Die Kapillaren wurden verschlossen und in den LightCycler (Roche, Mannheim, Dtl.) gestellt. Nach einer 15 minütigen Erhitzung auf 95°C und damit Aktivierung der HotStarTaq DNA-

Polymerase folgte das Temperaturprogramm mit 50 Zyklen: 15 Sekunden bei 94°C, Hybridisierung für 25 Sekunden bei 57°C und Elongation bei 72°C für 25 Sekunden. Um die Spezifität der PCR-Produkte zu bestätigen wurde nach der qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Zuerst wurden die relativen Standardkurven erhoben. Die Calibrator-cDNA wurde unverdünnt als auch 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 verdünnt (Nuklease-freies Wasser; Qiagen, Hilden, Dtl.) in einem Lauf mit den 3 β -HSD-II-Primern und in einem anderen Lauf mit den Neomycin-Primern amplifiziert und quantifiziert. Ein Koeffizient für die Effizienzkorrektur wurde erstellt.

Die cDNA der Mutanten und des Calibrators wurden 1:8 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und so in die RT-PCR eingesetzt.

4.7.4. Statistische Auswertung

Das Ergebnis der calibrator-normalisierten relativen Quantifizierung ist eine Funktion der PCR-Effizienz und der Bestimmung der Cps:

$$N = N_0 \times E^{Cp} \text{ mit } \begin{array}{ll} N & = \text{Anzahl der Moleküle im PCR-Zyklus} \\ N_0 & = \text{Ausgangsmenge Moleküle} \\ E & = \text{Amplifikationseffizienz} \end{array}$$

Diese relative Menge des Gens wird unter Verwendung der LightCycler Software 3.5 ermittelt und mit der relativen Quantifikations Software (Roche, Mannheim, Dtl.) die Effizienzkorrektur anhand der Standardkurven eingebracht. Resultat ist das relative Verhältnis von Target- zu Referenz-Gen.

Die Medianwerte der normalisierten Verhältnisse des WT und der Mutanten wurden mit dem Bonferroni-Test untereinander verglichen.

4.8. 3 D-Modell

Ein dreidimensionales Strukturmodell der 3 β -HSD wurde entwickelt, um die Beziehungen der einzelnen AS des c-terminalen Endes zum Gesamtprotein zu untersuchen und ihre funktionale Bedeutung zu klären.

Die Verwandtschaft der 3 β -HSD zu den SDR wurde mit Hilfe eines Proteinfaltungsalgorithmus (ProHit package, ProCeryon Biosciences GmbH,

Salzburg, Österreich) belegt (19). Die höchste AS-Homologie innerhalb dieser Proteinfamilie ergab sich für die dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase von *Streptomyces venezuelae* (39). Die Röntgenstruktur dieses Enzyms diente als Vorlage für das 3D-Modell der 3 β -HSD (PDB Zugangscode 1R6D). Das sequentielle Alignment diente als Vorlage zum Austausch der nicht konservierten AS, welches Datenbank basiert durchgeführt wurde (40). Die Geometrie des finalen Strukturmodells wurde hinsichtlich seiner potentiellen Energie mittels des GROMOS Programmpaketes minimiert (van Gunsteren, W.F., Laboratory of Physical Chemistry, University of Groningen, Niederlande, Vertrieb durch BIOMOS biomolecular software b.v.). Die Darstellung des 3D-Modells erfolgte mit dem Deep View/ Swiss-PDB Viewer Programm (40, 41).

5. Ergebnisse

5.1. Mutationsanalyse

Die Sequenzierung des *HSD3B2* Gens des ersten Patienten zeigte eine homozygote Mutation in Exon 4, bei der es zu einem Basenaustausch von Guanin (G) durch Adenin (A) kam (c.1064G>A). Es handelt sich um eine Nonsense-Mutation, die den Einbau eines verfrühten Stopp-Codons anstelle der AS Tryptophan in Codon 355 bewirkte (p.W355X). Die Sequenzen der weiteren Exons und Exon-Intron-Übergänge waren unauffällig. Innerhalb der Familie waren sowohl die Mutter als auch der Vater heterozygote Träger der Mutation (s. Abb. 4).

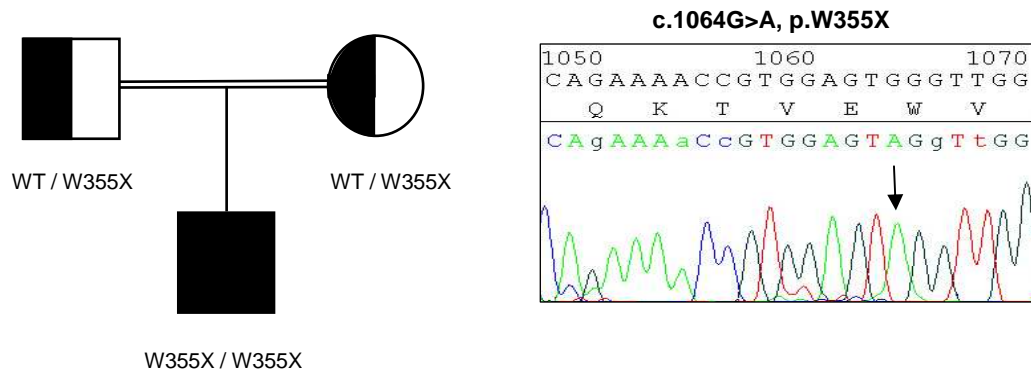


Abbildung 4: Stammbaum und DNA-Sequenz des Patienten 1; Erklärung s. Text

Bei der DNA-Analyse der Patienten 2 und 3 wurde festgestellt, dass in Exon 4 die Base Cytosin (C) gegen Thymin (T) ausgetauscht wurde (c.1003C>T). Diese Nonsense-Mutation führte zu einem vorzeitigen Stopp-Codon an Position 335 des Proteins (p.R335X). Alle weiteren Sequenzen waren ebenfalls unauffällig. Die Geschwister waren homozygot, während die Eltern heterozygot für diese Mutation waren (s. Abb. 5).

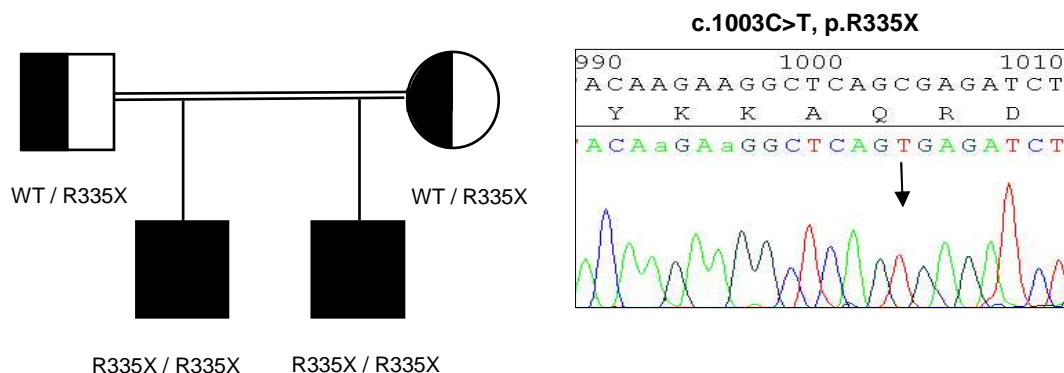


Abbildung 5: Stammbaum und Basenabfolge der Patienten 2 und 3; Erklärung s. Text

5.2. Expressionsanalyse

5.2.1. Vergleich der Expressionsvektoren pcDNA3 und pCMV

Die Aktivitäten des über den Expressionsvektor pcDNA3 exprimierten Wildtyps und des pCMV Wildtyps in lebenden Cos-7-Zellen waren in der statistischen Auswertung nicht signifikant unterschiedlich. Die K_M - und V_{max} -Werte der WT-3 β -HSD-II zeigten keine bedeutsamen Differenzen (K_M für WT-pcDNA3 $0.40 \pm 0.08 \mu\text{M}$, K_M für WT-pCMV $0.42 \pm 0.04 \mu\text{M}$; V_{max} für WT-pcDNA3 $243.5 \pm 14.6 \text{ pmol/min/well}$, V_{max} für WT-pCMV $219.8 \pm 6.1 \text{ pmol/min/well}$). Die Enzymaktivität der 3 β -HSD-II gekoppelt an den Expressionsvektor pCMV wurde als Referenzaktivität definiert und folglich alle Expressionsanalysen mit den pCMV-*HSD3B2*-Konstrukten durchgeführt. Die Bezeichnungen der Mutanten und des WT in den nachfolgenden Experimenten beziehen sich stets auf die pCMV-*HSD3B2*-Konstrukte.

5.2.2. Umsatz von Pregnenolon zu Progesteron

Die Syntheserate von Progesteron aus Pregnenolon durch die 3 β -HSD-II des WT, der Mutanten und des Leervektors bei einer Ausgangskonzentration von $1.0 \mu\text{mol/l}$ Pregnenolon sind in Abbildung 6 dargestellt.

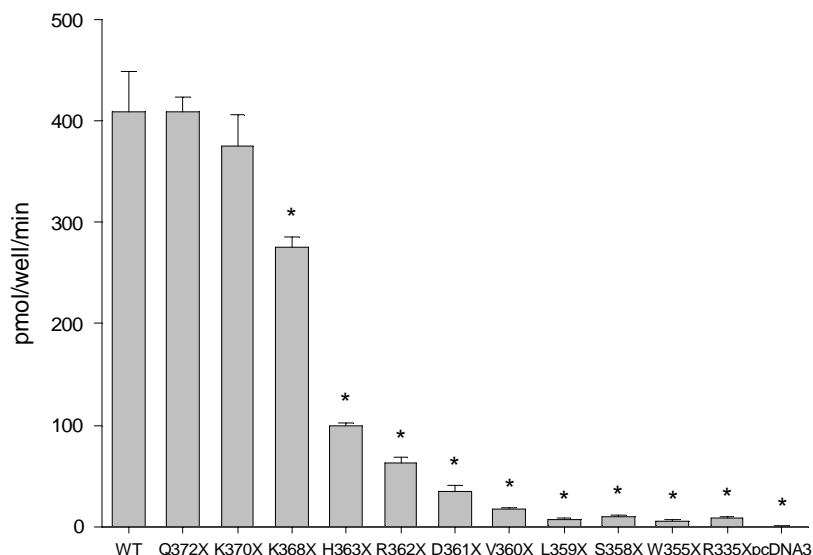


Abbildung 6: Reaktionsgeschwindigkeiten des WT, der Mutanten und des Kontrollvektors bezüglich der Umsetzung von Pregnenolon zu Progesteron in pmol/well/min bei einer Ausgangskonzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ Pregnenolon; (*) bedeutet signifikant unterschiedlich im Vergleich zum WT, $p < 0.05$

Der WT hatte eine Umsatzrate von 408.70 ± 40.85 pmol/well/min. Die Mutanten Q372X und K370X hatten mit $100.0 \pm 3.7\%$ bzw. mit $91.9 \pm 7.5\%$ der WT-Aktivität keinen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität ($p > 0.05$). Alle kürzeren Proteine führten dazu, dass die transfizierten Zellen eine signifikant reduzierte Syntheserate im Vergleich zum WT hatten (K368X $67.3 \pm 2.6\%$, H363X $24.3 \pm 0.7\%$, R362X $15.3 \pm 1.4\%$, D361X $8.3 \pm 1.5\%$, V360X $4.3 \pm 0.4\%$, L359X $1.6 \pm 0.3\%$, S358X $2.2 \pm 0.6\%$, W355X $1.4 \pm 0.3\%$ und R335X $1.9 \pm 0.5\%$). Der Kontrollvektor pcDNA3 zeigte keine endogene 3 β -HSD-II-Aktivität.

5.2.3. Umsatz von DHEA zu Androstendion

Die WT-Aktivität für die Umwandlung von $0.5 \mu\text{mol/l}$ DHEA zu Androstendion betrug 128.20 ± 2.47 pmol/well/min (s. Abbildung 7). Alle Stopp-Mutationen bewirkten einen signifikanten Abfall der 3 β -HSD-II-Leistung im Vergleich zum WT ($p < 0.05$). Die Mutationen Q372X, K370X und K368X behielten mehr als 50 Prozent der WT-Aktivität bei (Q372X $85.2 \pm 4.6\%$, K370X $79.6 \pm 3.6\%$, K368X $64.2 \pm 2.0\%$), wohingegen die Mutationen H363X, R362X und D361X weniger als 50 Prozent erreichten (H363X $29.9 \pm 3.5\%$, R362X $32.4 \pm 4.1\%$, D361X $14.7 \pm 1.0\%$).

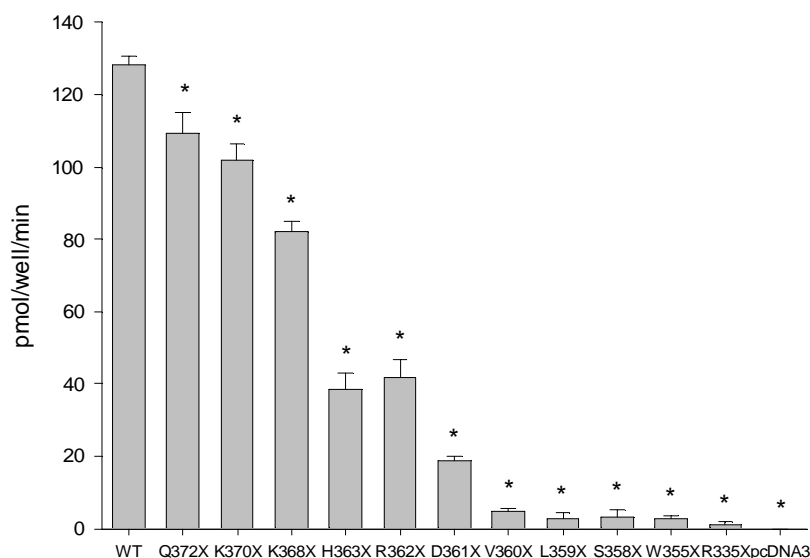


Abbildung 7: Umsatzgeschwindigkeit von DHEA zu Androstendion des WT, der Mutanten und des Leervektors in pmol/well/min bei einer Ausgangskonzentration von $0.5 \mu\text{mol/l}$ DHEA; (*) bedeutet signifikant unterschiedlich im Vergleich zum WT, $p < 0.05$

Die Mutationen V360X, L359X, S358X, W355X und R335X verringerten den Umsatz von DHEA zu Androstendion auf weniger als 5 Prozent und wurden nicht für die Untersuchung der Enzymkinetik ausgewählt (V360X $3.8 \pm 0.7\%$, L359X $2.0 \pm 1.4\%$,

S358X $2.3 \pm 1.7\%$, W355X $2.1 \pm 0.7\%$, R335X $0.8 \pm 0.5\%$). Keine 3β -HSD-II-Aktivität zeigte der Leervektor pcDNA3.

5.3. Enzymkinetik

Von den Mutanten, die Restaktivität zeigten (Q372X, K370X, K368X, H363X, R362X und D361X), wurde die Umsatzgeschwindigkeit von DHEA zu Androstendion in Abhängigkeit von der DHEA-Konzentration bestimmt und eine Enzymkinetik erstellt.

V_{\max} für die Synthese von Androstendion des WT betrug $220.43 \pm 5.6 \mu\text{mol/well/min}$. Alle ausgewählten Mutanten erreichten eine Substratsättigung mit konstanter Umsetzungsgeschwindigkeit, die im Vergleich zum WT reduziert war. Analog der Bildungsrate bei $0.5 \mu\text{mol/l}$ DHEA, entsprechend der K_M des WT, erreichten Q372X, K370X und K368X über 50 Prozent und H363X, R362X und D361X weniger als 50 Prozent von V_{\max} des WT (Q372X $74.9 \pm 8.5\%$, K370X $77.6 \pm 3.0\%$, K368X $61.8 \pm 8.3\%$, H363X $36.4 \pm 19.1\%$, R362X $29.3 \pm 2.2\%$, D361X $16.1 \pm 3.3\%$). Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ war V_{\max} aller Mutanten signifikant niedriger als beim WT. Die K_M -Werte der einzelnen Mutanten und des WT unterschieden sich statistisch nicht ($p < 0.05$). Der K_M -Wert des WT betrug $0.42 \pm 0.05 \mu\text{mol}$ (V_{\max} und K_M -Werte der Mutanten s. Tab.8 im Anhang).

Die Abbildung 8 stellt die Enzymkinetik der einzelnen Mutanten und des WT dar.

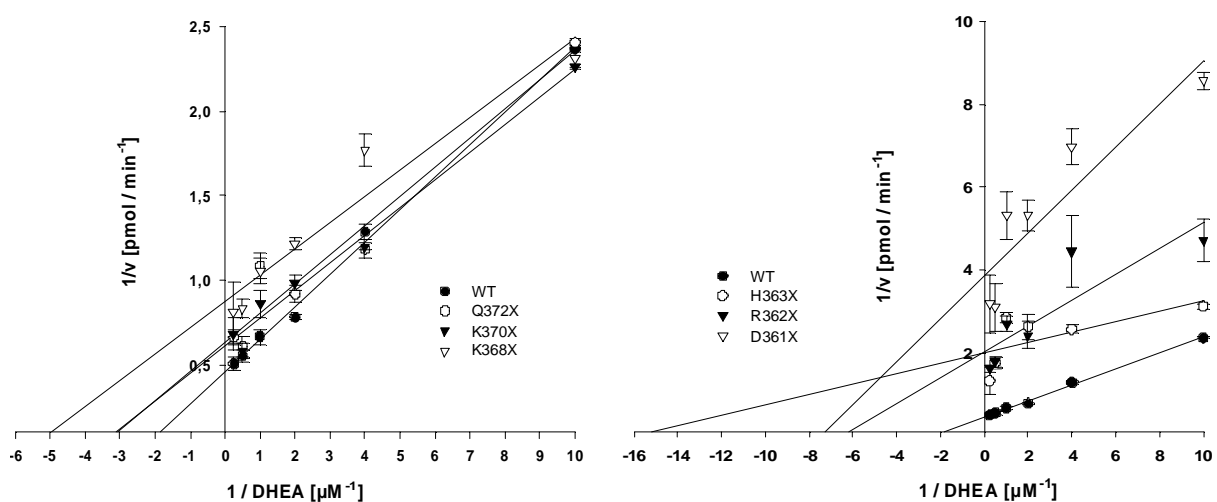


Abbildung 8: Lineweaver-Burk-Diagramme; links für den WT, Q372X, K370X und K368X; rechts für den WT, H363X, R362X und D361X; Schnittpunkt mit der x-Achse ist $-1/K_M$; y-Achsenabschnitt ist $1/V_{\max}$

Eine Kinetik mit Pregnenolon konnte nicht durchgeführt werden, da der Alkoholanteil,

in dem Pregnenolon gelöst werden musste, bei höheren Hormonkonzentrationen im Verhältnis zum Medium anstieg und die Zellen diese Exposition nicht überlebten.

5.4. Western Blot

Aus den Gesamtproteinen, die aus den transfizierten Cos-7 Zellen gewonnen wurden, konnte im Western Blot der Nachweis der c-myc konjugierten 3 β -HSD-II erbracht werden. Die Laufstrecke des WT-Proteins entsprach dem molekularen Gewicht der 3 β -HSD-II von ca. 40kDa (22). Alle Mutanten zeigten eine spezifische Bande, die zu den stärker verkürzten Mutanten hin an Laufstrecke zu- und an Intensität abnahm. Eine Ausnahme stellte D361X dar, bei der die Intensität stärker als bei R362X war.

Der Kontrollvektor pcDNA zeigte kein detektierbares 3 β -HSD-II Protein (s. Abbildung 9).

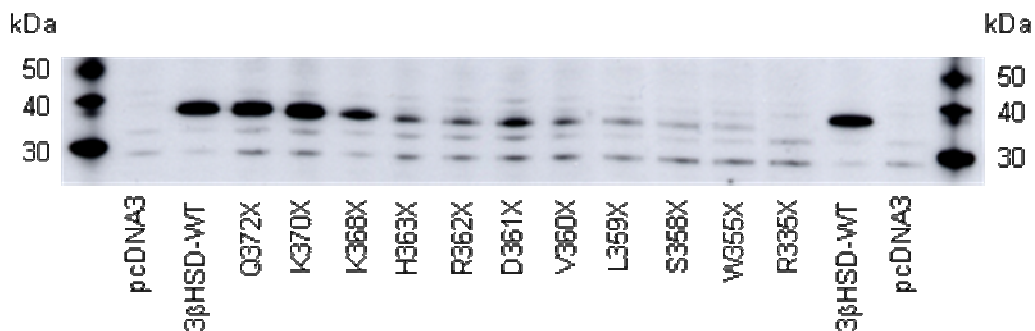


Abbildung 9: Western Blot Analyse; Erklärung s. Text

5.5. Intrazelluläre 3 β -HSD-II-Lokalisation

Die Fluoreszenzbilder in Abbildung 10 zeigen jeweils eine Cos-7 Zelle, die die 3 β -HSD-II als WT bzw. als Mutante (Q372X) exprimierte. Der rote Fluoreszenzfarbstoff stellte die Lokalisation der 3 β -HSD-II, die grüne Fluoreszenz repräsentiert Calnexin und somit das ER und die blaue Fluoreszenz stellt den Zellkern dar. Die gelbe Farbe entstand bei der Fusion der beiden Bilder, da Rot und Grün sich mischten und schlussfolgernd die 3 β -HSD-II im ER lokalisiert war. Es wurde an dieser Stelle nur eine Mutante exemplarisch dargestellt, da alle Mutanten das gleiche Ergebnis aufwiesen (s. Tab. 9 im Anhang).

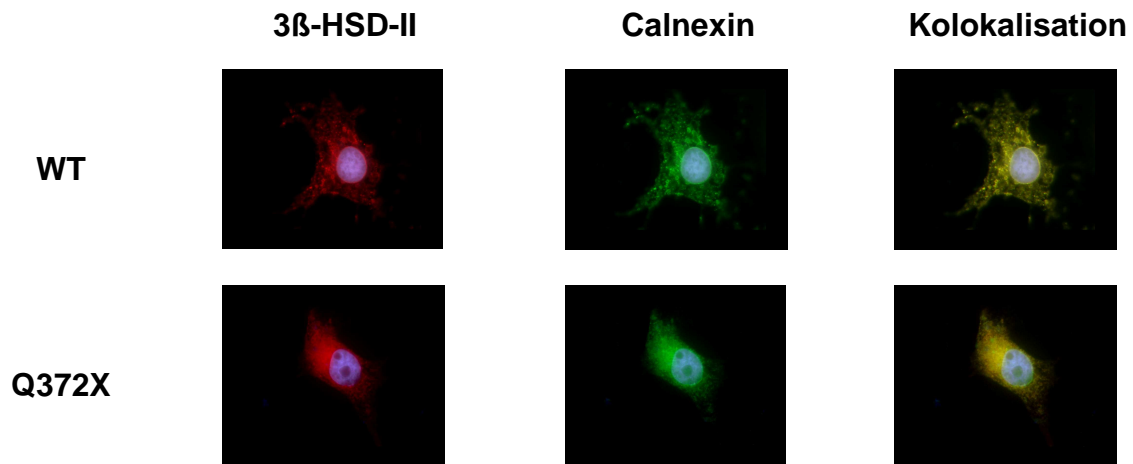


Abbildung 10: Immunfluoreszenzbilder; linke Bilderreihe Lokalisation der 3β-HSD-II; mittlere Bilderreihe Lokalisation von Calnexin im ER; rechte Bilderreihe Co-Lokalisation der 3β-HSD-II und des ERs; 100-fache Vergrößerung

5.6. qRT-PCR

Für die mit dem WT transfizierten Zellen ergab sich ein relatives Verhältnis der mRNA-Konzentrationen von 3β-HSD-II zu Neomycin von 0.51 ± 0.05 . Auch bei den Mutationen wurde stets relativ mehr mRNA von Neomycin als von der 3β-HSD-II gebildet (s. Abbildung 11). Die normierten Verhältnisse der Mutanten im Vergleich zum WT zeigten bei $p < 0.01$ keine signifikanten Unterschiede.

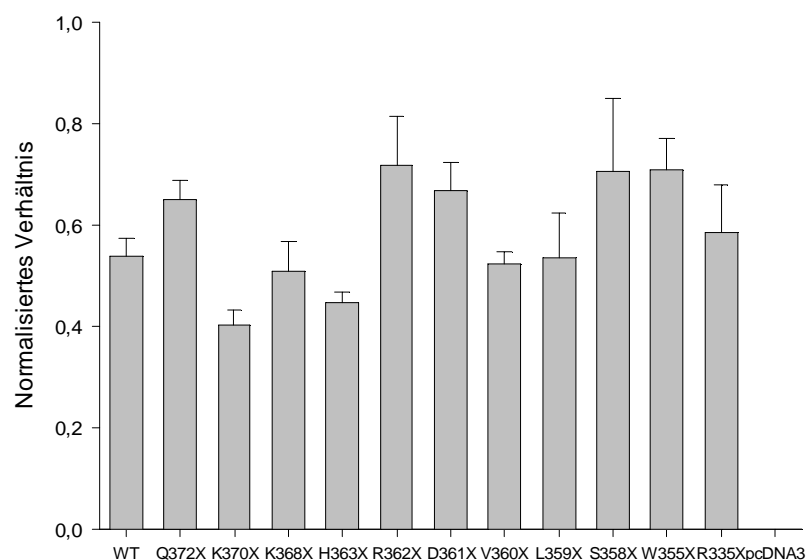


Abbildung 11: relatives Verhältnis von mRNA der 3β-HSD-II und Neomycin für den WT, die Mutanten und den Leervektor

5.7. 3D-Modell

Bei der dreidimensionalen Betrachtung des 3 β -HSD Modells stellte sich der C-Terminus als α -Helix L dar (s. Abb. 12).

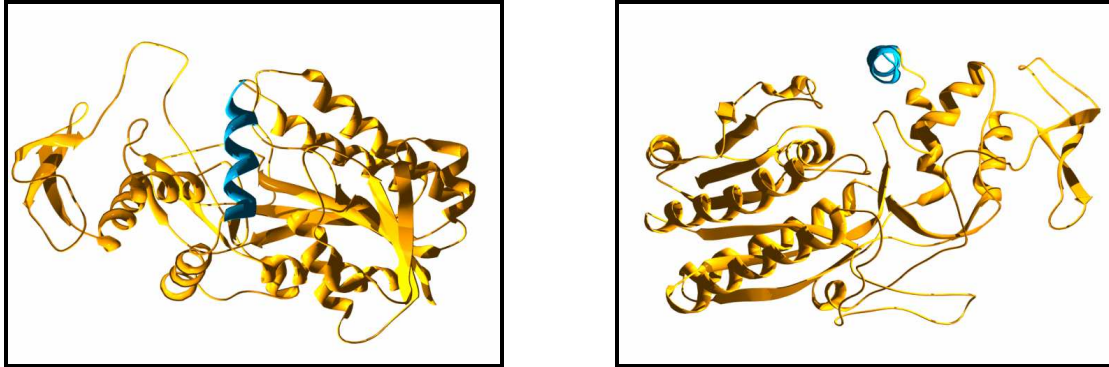


Abbildung 12: Dreidimensionale Struktur der 3 β -HSD in Beziehung zu der blau dargestellten c-terminalen α -Helix L

Die Seitenkette der letzten AS Glutamin (Q372) zeigte frei in den Lösungsmittelraum, so dass ein Verlust (Q372X) zu keinem vorhersehbaren Ereignis führen würde.

Die vorletzte AS Lysin (K370) stand mit Aspartat⁸⁶ und Glutamat¹⁹² über stabilisierende Salzbrücken in Verbindung (s. Abb. 13A).

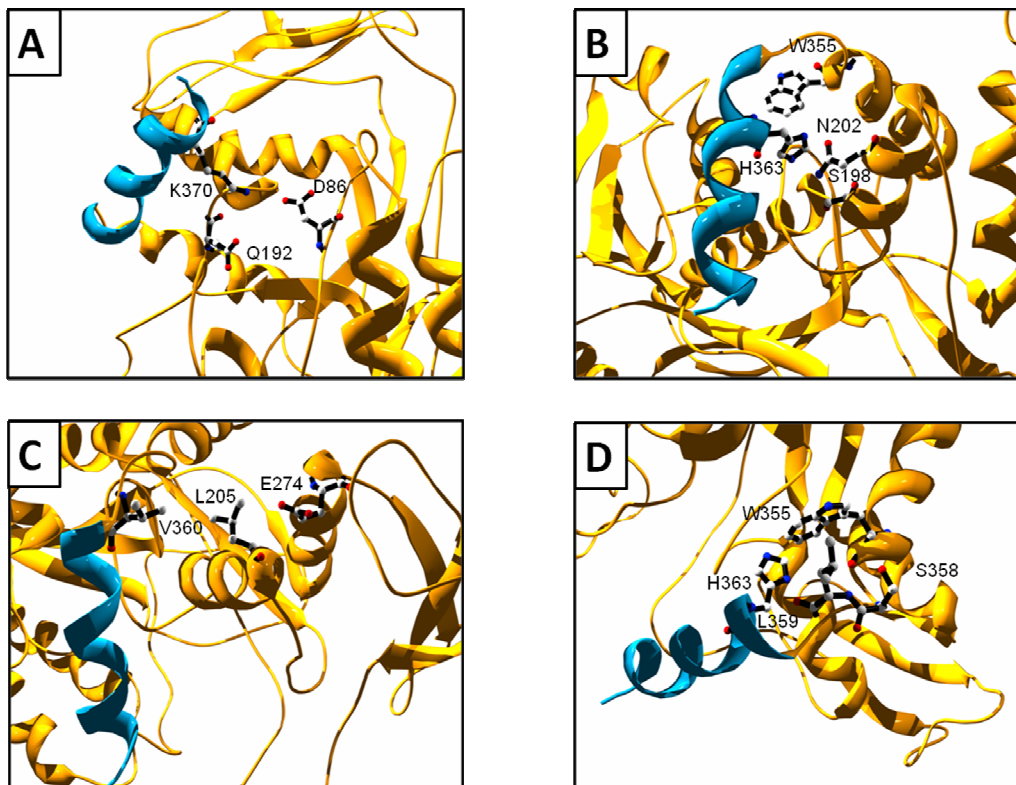


Abbildung 13: Vergrößerte räumliche Darstellung der AS (A) K370, (B) H363, (C) V360, (D) W355 und deren Interaktionspartner; Details s. Text

Aspartat⁸⁶ selbst lag in der membranüberspannenden Domäne (Aspartat⁷⁴ bis Valin⁹⁰) (13). Die Seitenketten von Glutamat¹⁹² und des proximal von Aspartat⁸⁶ liegenden Isoleucin⁸⁵ zeigten direkt in die NAD⁺-Bindungstasche des Amino-Terminus (14). Ein artifizielles Stopp-Codon an dieser Position (K370X) könnte durch die fehlenden Interaktionen indirekt die Konformation der Cofaktor-Bindungstasche verändern, wodurch die Bindung von NAD⁺ beeinträchtigt sein könnte. Die Konservierung von Lysin³⁷⁰ unter den Vertebraten spiegelt die wichtige Rolle dieser AS für die Struktur der 3 β -HSD wieder (s. Abb. 14) (42).

	331	341	351	361	371
Human II	KKAQRDLAYK	PLYSWEEAKQ	KTVEWVGS SLV	DRH KETL KSK	TQ
Human I	KKAQRDLAYK	PLYSWEEAKQ	KTVEWVGS SLV	DRH KETL KSK	TQ
Makake I	KKAQRDLAYK	PLYSWEEAKQ	KTVEWVGS SLV	DRH KETL KSK	TQ
Maus I	KKAQRDLG YV	PLVSWEEAKQ	KTSEW IGT LV	EQH RETLD TK	SQ
Ratte I	KKAQRDLG YE	PLV N WEEAKQ	KTSEW IGT V	EQH RE ILD TK	CQ

Abbildung 14: Konservierung des C-Terminus der 3 β -HSDs; die Typ I 3 β -HSD des Makaken, der Maus und der Ratte entsprechen der humanen 3 β -HSD-II; fett gedruckt sind die AS, die artifizuell gegen ein Stopp-Codon ausgetauscht wurden; grau unterlegt sind nicht übereinstimmende AS

Das Codon K368 codierte ebenfalls für Lysin, das allerdings keine Wechselwirkungen aufzeigte, so dass ein Kettenabbruch an dieser Stelle (K368X) nur in einer weiteren Verkürzung des Proteins resultieren würde.

Histidin³⁶³ ist eine hoch konservierte AS (s. Abb. 14), deren Seitenketten eine stabile polare Bindung mit Serin¹⁹⁸ und Asparagin²⁰² einging (s. Abb. 13B). Diese AS waren wiederum an der Stabilisierung der α -Helix G beteiligt, die der Substratbindungsstelle bzw. der Isomeraseaktivität anlag. Bei physiologischem pH wäre Histidin ungeladen und ginge zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen mit Tryptophan³⁵⁵ ein. Ein Translationsstopp (H363X) könnte zur Dislokation von α -Helix G führen und dadurch die Affinität und Aktivität der 3 β -HSD negativ beeinflussen. Zusätzlich könnte die lange Seitenkette von Arginin³⁶² sich neu orientieren und eventuell in die Substratbindungstasche hineinragen.

Die Seitenketten von Arginin³⁶² (R362) und Aspartat³⁶¹ (D361) wiesen keine Verbindungen auf und zeigten frei in den Lösungsmittelraum. Eine Termination (R362X, D361X) würde den C-Terminus weiter reduzieren.

Valin³⁶⁰ gehört zu den hochkonservierten AS (s. Abb. 14) und stellte sich im 3D-Modell als erste AS der α -Helix L dar. Die Seitenkette ging hydrophobe Wechselwirkungen zu Leucin²⁰⁵ ein, wobei Leucin²⁰⁵ stabilisierenden Charakter auf Glutaminsäure²⁷⁴ ausübte und dieses dem Aktivitätszentrum (Glycin²⁵⁰ bis Lysin²⁷³)

direkt anlag (s. Abb. 13C) (11). Der Verlust von 12 AS (V360X) führt zur Deletion der gesamten c-terminalen α -Helix. Das Enzym würde alle bisher genannten stabilisierenden Verbindungen verlieren. Die Instabilität könnte sich auf die Bereiche der NAD^+ -Bindung, Substrataffinität und 3β -HSD-Aktivität negativ auswirken bis hin zum Verlust der Tertiärstruktur des Enzyms.

Proximal von der α -Helix L in der Linkerregion zu der α -Helix K lag die AS Leucin (L359), dessen Seitenkette mit Tryptophan³⁵⁵ in Kontakt stand. Das Ende der vorletzten α -Helix bildete Serin³⁵⁸. Der Sauerstoff von Serin³⁵⁸ bildete mit dem Sauerstoff der Peptidbindung vom Tryptophan³⁵⁵ eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Das Codon W355, das bei dem Patienten 1 eine Stopp-Mutation trug, codierte für Tryptophan³⁵⁵. Tryptophan³⁵⁵ bildete neben den bereits genannten Verbindungen zu Histidin³⁶³, Leucin³⁵⁹ und Serin³⁵⁸ auch noch stabilisierende Wechselwirkungen mit Isoleucin¹⁸⁹ aus (s. Abb. 13D). Die Position für die Stopp-Mutation der Patienten 2 und 3 (R335X) repräsentierte Arginin. Distal von Arginin³³⁵ lagen ein β -Faltblatt und die zwei α -Helices L und K. Kettenabbrüche proximal der α -Helix L würden die 3β -HSD zusätzlich zum Verlust des C-Terminus um weitere AS verkürzen.

6. Diskussion

6.1. Genotyp und Phänotyp bei c-terminalen Stoppmutanten der HSD3B2

Alle Patienten dieser Arbeit zeigten typische klinische Merkmale des klassischen 3 β -HSD-II-Mangels (3). Die männlichen Neugeborenen kamen mit einem ambivalenten äußeren Genitale zur Welt (46, XY DSD) und entwickelten im Laufe der ersten Lebensstage eine Nebenniereninsuffizienz mit Salzverlust. Die Hormonanalysen deuteten auf einen Enzymdefekt der 3 β -HSD-II hin und auf DNA-Ebene konnten bei den Kindern die homozygoten Stopp-Mutationen W355X bzw. R335X im *HSD3B2* Gen festgestellt werden. Da die Eltern jeweils heterozygote Träger der kindlichen Mutation waren, liegt ein autosomal-rezessiver Erbgang nahe.

Bei den untersuchten Geschwistern verursachte dieselbe Stopp-Mutation (R335X) unterschiedliche phänotypische Ausprägungen der äußeren Genitale. Der ältere Bruder wies ein Sinnecker Stadium III und der jüngere Bruder ein Sinnecker Stadium II auf. Die phänotypische Variabilität bei derselben genetischen Veränderung ist bekanntermaßen keine Ausnahme. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Missense-Mutation R249X gemacht, die bei drei männlichen Patienten zu Sinnecker Stadien II bis IV führte (6). Auch die Leserahmenverschiebung 273 del AA resultierte bei einem Patienten in perinealer Hypospadie und bei einem anderen in Hypospadie mit bipartitem Skrotum (beide XY) (43). Die homozygote Mutation A10E stellt ein weiteres Beispiel dar, bei der ein männliches Neugeborenes mit ambivalentem Geschlecht und palpablen Testikeln im bipartitem Skrotum zur Welt kam und im Gegensatz dazu ein weibliches Neugeborenes keine genitalen Auffälligkeiten zeigte (44). Erklärungsansätze für die beschriebenen Beobachtungen beruhen auf dem Vorkommen der 3 β -HSD-I in extraadrenalem und extragonadalem Gewebe insbesondere in der Plazenta. Die 14- bis 17-fach höhere Affinität der 3 β -HSD-I wandelt Δ^5 -Steroide, die in peripheren Geweben gewöhnlich in geringer Konzentration vorkommen, in die Δ^4 -Steroide um (22, 45, 46). Die individuelle Expression der 3 β -HSD-I als auch individuell unterschiedliche Expressionsprofile von Proteinen, die die Androgenwirkung vermitteln, könnten ein Grund für die unterschiedlichen Ausprägungsgrade der ambivalenten Genitale sein.

Trotz der unterschiedlichen genitalen Merkmale ähnelten sich die Elektrolytwerte der Patienten dieser Studie. Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der sexuellen

Differenzierungsstörung und des Salzverlustes existiert in der Literatur nicht (27). Es gibt Beispiele für Patienten mit perineoskrotaler Hypospadie (Sinnecker Stadium III) ohne Salzverlust (homozygote Mutation A10V) als auch für Patienten mit Salzverlust und ein Sinnecker Stadium II (z.B. die homozygoten Mutationen G15D oder 273 delta AA) (9, 43, 47).

Derzeitige Vorstellung der molekularen Grundlage des 3 β -HSD-II-Defektes ist, dass bei Patienten mit Salzverlustkrise kein funktionstüchtiges 3 β -HSD-II-Enzym exprimiert wird (8). Diverse Publikationen weisen darauf hin, dass homozygote Missense-Mutationen, die mit lebensbedrohlichem Salzverlust assoziiert sind (A10E, G15D, L205P, P222Q, T259R), keine detektierbare Enzymaktivität besitzen (6, 9, 44, 47, 48). In Analogie dazu zeigten die Patienten dieser Studie Hyponatriämie sowie Hyperkaliämie und die Stopp-Mutationen W355X und R335X in der *in vitro* Expressionsanalyse einen Verlust der 3 β -HSD-II-Aktivität. Da die Stopp-Mutationen E135X, W171X und R249X, deren Expressionsprofile bislang nicht untersucht wurden, einen Kettenabbruch proximal von den untersuchten Mutationen bewirken, dürften auch sie keine 3 β -HSD-II-Aktivität aufweisen (6, 49, 50).

6.2. Funktionelle Charakterisierung der 3 β -HSD-II Mutanten

Die Expression mutierter 3 β -HSD-II-Proteine in transfizierten Cos-7 Zellen konnte im Western Blot nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit und in diversen Publikationen zeigten gewisse Mutanten eine schwächere Bandenintensität im Vergleich zum WT auf (K368X-R335X, A82T, A167V, P222Q etc.). Der Proteinnachweis blieb bei Mutationen in den Codons 10, 15, 108, 186 sogar erfolglos (5, 7, 9, 51). Ein denkbarer Zusammenhang zwischen der Detektierbarkeit der 3 β -HSD-II im Western Blot und der Restaktivität konnte nicht erbracht werden. Das rekombinante Enzym mit der Mutation D361X wies eine stärkere Bandenintensität auf als Enzyme, deren Restaktivität deutlich höher war (z.B. H363X). Weitere Beispiele aus der Literatur zeigen, dass auf der einen Seite bei den Mutanten A10V und L173R, deren 3 β -HSD-II-Restaktivität bei 29 bzw. 53 Prozent lag, keine spezifische 3 β -HSD-II-Bande nachweisbar war und auf der anderen Seite die P155L-Mutante die stärkste Bandenintensität bedingte, obwohl sie keine ersichtliche Enzymaktivität besaß (9).

Theoretisch wäre eine Regulation der Proteinmenge in der Zelle auf

Transkriptionsebene möglich, bei der mutierte Gene mit einer anderen Frequenz als das native Gen abgelesen würden oder es zu einem vorzeitigen Abbau einer mutanten mRNA kommen würde (nonsense mediated decay). Mit Northern Blot Analysen wurde zuvor nachgewiesen, dass alle mutierten Gene transkribiert und die dazugehörigen mRNAs produziert wurden (7, 9, 51). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun mit Hilfe der qRT-PCR gezeigt werden, dass die Quantität der mRNA-Produktion unabhängig von den untersuchten Mutationen im *HSD3B2* Gen war. In allen Zellen wurde das gleiche Verhältnis von HSD3B2- und Neomycin-Gen transkribiert. Schlussfolgernd findet auf Transkriptionsebene keine differenzierte Regulation der Proteinmenge statt.

Eine weitere Möglichkeit für die geringere Konzentration rekombinanter mutierter Enzyme ist deren verstärkter Abbau in der Zelle. Nicht korrekt gefaltete Proteine sind instabil und degradieren vorzeitig. Welzel *et al.* demonstrierten, dass der Proteasom Inhibitor MG 132 die Proteolyse des 3 β -HSD-II-Proteins reduzierte. Mit dieser Methode konnte die Enzymmenge in den Zellen und infolge dessen die Bandenintensität im Western Blot gesteigert werden (5). Die vorzeitige Degradation mutierter Proteine erklärt die Abwesenheit funktionsloser Enzyme. Die deutliche Nachweisbarkeit spezifischer funktionsuntüchtiger Enzyme (P155L) im Western Blot zeigt jedoch, dass dieser Mechanismus nicht generell abläuft, sondern wahrscheinlich vom Schweregrad der Strukturveränderung des mutanten Enzyms abhängt (9). Die erfolglose Darstellung von mutierten 3 β -HSD-II-Enzymen mit hoher Restaktivität (A10V, L173R) könnte auch durch eine herabgesetzte Bindungsaffinität des Antikörpers bei spezifischen Konformationsänderungen des 3 β -HSD-II Enzyms erklärt sein.

Die Translokation der 3 β -HSD-II in das ER war durch die Mutationen erwartungsgemäß unbeeinträchtigt, da die Mutationen nicht im Bereich der membranüberspannenden Domänen zwischen Asparaginsäure⁷⁴ und Valin⁹⁰ oder Serin²⁸⁴ und Tyrosin³⁰⁸ lagen (13, 52).

6.3. Zusammenhänge von Struktur und Funktion

Der C-Terminus der einzelnen SDRs zeigt einen individuellen Aufbau, um die enzymspezifische Funktion zu gewährleisten (19, 53). Dadurch ist der Vergleich des C-Terminus der 3 β -HSD-II mit anderen Mitgliedern der Proteinfamilie erschwert und gibt keine Hinweise auf die Funktion des distal der Substratbindungsdomäne

(Glycin²⁵⁰ bis Lysin²⁷³) bzw. der Membranbindungsdomäne (Serin²⁸⁴ bis Tyrosin³⁰⁸) gelegenen Teils (12, 13).

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass der sukzessive Verlust von AS am C-Terminus mit einer zunehmenden Reduktion der V_{\max} der 3 β -HSD-II einherging. Im Detail wurde im 3D-Modell ersichtlich, dass mit steigender Zahl fehlender AS die Anzahl stabilisierender Interaktionen vermindert wurde. Der Wegfall polarer Verbindungen induzierte eine zunehmende Strukturinstabilität des Proteins, die sich negativ auf die 3 β -HSD-II-Aktivität auswirkte. Insbesondere der Verlust hoch konservierter AS, die typischerweise mehrere Interaktionspartner aufwiesen, ging mit einem deutlichen Einschnitt der 3 β -HSD-II-Aktivität einher (z.B. K370X, H363X). Missense-Mutationen in anderen hoch konservierten Bereichen führten ebenfalls zum Verlust der Enzymaktivität (z.B. P155L) (9, 54).

Die Kürzung der gesamten c-terminalen α -Helix L führte nahezu zum Versiegen der 3 β -HSD-II-Aktivität. In Übereinstimmung mit der Aussage von Alvarez *et al.* (10), dass der Verdau des gesamten cytoplasmatisch gelegenen C-Terminus den Verlust der Enzymaktivität nach sich ziehe, konnte nun in dieser Arbeit das Fehlen von mehr als zehn aufeinanderfolgenden AS dafür verantwortlich gemacht werden.

Die Bindungsaffinität der rekombinanten 3 β -HSD-II-Enzyme (K_M -Wert) für DHEA zeigte keine Differenzen, da die untersuchten Mutationen außerhalb der Substratbindungsdomäne lokalisiert waren. Der c-terminale Verlust an AS schien keine Konformationsänderung des aktiven Zentrums zu bewirken und somit keinen Einfluss auf den Bindungscharakter auszuüben. Mutationen in Codons, die an der Bildung der Substratbindungsdomäne beteiligt waren, hatten vernichtende Auswirkungen auf die 3 β -HSD-II-Aktivität (Y253N, Y254D, T259R, T259M) (6, 8, 9).

Eine Enzymkinetik für die Mutationen mit weniger als 5 Prozent Restaktivität konnte nicht erstellt werden, da die experimentellen Bedingungen die Detektion geringer Hormonkonzentrationsunterschiede nicht leisten konnten. Bereits in der Erprobung sind Versuchsreihen mit dem Tandemmassenspektrometer mit der Erwartung die Hormonkonzentrationen extrem genau zu messen.

7. Zusammenfassung

Die klinische Verdachtsdiagnose eines 3beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -Isomerase Typ II (3 β -HSD-II) Mangels bei drei männlichen Neugeborenen mit ambivalentem Genitale und Salzverlustkrise, konnte auf DNA-Ebene bestätigt werden. Es wurden zwei bisweilen unbekannte homozygote Stopp-Mutationen R335X bzw. W355X identifiziert, die unter den bereits bekannten Mutationen am weitesten distal innerhalb des *HSD3B2* Gens liegen und den c-Terminus des Enzyms verkürzen. *In vitro* Studien mit rekombinant hergestellten Enzymen, die die gefundenen Mutationen trugen, ergaben praktisch einen Verlust der 3 β -HSD-II-Aktivität. Eine Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad der sexuellen Differenzierungsstörung als auch der Nebenniereninsuffizienz und der Restaktivität des Enzyms konnte nicht dargestellt werden.

Mit Hilfe weiterer artifiziell verkürzter Enzymmutanten wurde versucht die Funktion und Struktur des c-Terminus zu charakterisieren. Es zeigte sich in der Expressionsanalyse, dass sich die Aktivität der 3 β -HSD-II für die Bildung von Progesteron und Androstendion sukzessiv mit dem Verlust an distalen Aminosäuren reduzierte. Insbesondere Terminationen im Bereich hoch konservierter Aminosäuren, z.B. H363, führten zu erheblichen Syntheseeinschnitten. Der direkte Proteinnachweis der mutierten Enzyme erfolgte im Western Blot, der verschieden starke Bandenintensitäten der Translationsprodukte abbildete. Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Enzymmengen in der Zelle wurde die differentielle Transkription mutierter Gene mittels einer relativen Quantifizierungstechnik untersucht. Das Ergebnis demonstrierte, dass die untersuchten Mutationen keinen Einfluss auf die Quantität der mRNA-Produktion ausübten. Dadurch wurde die Hypothese einer niedrigeren Transkriptionsrate des mutierten Gens als auch die Theorie eines vorzeitigen Abbaus der mutierten mRNA widerlegt.

Am 3D-Modell wurde ersichtlich, dass speziell diese Aminosäuren typischerweise mehrere Interaktionspartner aufzeigten und bei einem Wegfall eine Stabilitätseinbuße des Enzyms auslösten. Die zunehmende Verkürzung des c-terminalen Endes resultierte in einer stetig ansteigenden Instabilität des residualen Proteins, so dass es bei einem Verlust von 12 Aminosäuren (V360) und einer Deletion der gesamten c-terminalen α -Helix L zur Reduktion der Enzymaktivität auf unter 5 Prozent des nativen Enzyms kam. Die c-terminale α -Helix zeigte sich hiermit als essentiell für die Integrität und die Funktion der 3 β -HSD-II.

8. Anhang

Tabelle 1: PCR-Primer

Exon	Primer	Sequenz	Annealingtemperatur
1,2	3-BETA-1-S	5'-CTC CAG TCC TTC CTC CAG GG-3'	55°C
1,2	3-BETA-2-AS	5'-AGG TCA ACC TCC CCA CAC CC-3'	55°C
3	3-BETA-3-S	5'-TCA CGG ATG TGT GAC AAT TA-3'	51°C
3	3-BETA-4-AS	5'-CTG ATC CTC ATT TAA TCA AC-3'	51°C
4	3-BETA-5-S	5'-CAT GTG GTT GCA GCT CCT TT-3'	55°C
4	3-BETA-6-AS	5'-GAA GAA GAC AGT AAG TTG GG-3'	55°C

Tabelle 2: Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz	Annealingtemperatur
3-BETA-7 S	5'-ACT TTG TAC ACT TGT GC-3'	47°C
T7 fwd.	5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GA-3'	55°C
576 S	5'-AGG AGG CCC ATT CCT TTC T-3'	52°C
sp6 rev.	5'-CAT TTA GGT GAC ACT A-3'	55°C
678 rev.	5'-GCC AAC ATA GAC TGG GTT GAC T-3'	55°C
T3 rev.	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	54°C

Tabelle 3: Mutageneseprimer

Mutation	Primer	Sequenz
Position 1114 C→t	Q372X-fw	5'-C CTG AAG TCC AAG ACT tAG TGA TTT AAG GAT G-3'
	Q372X-rev	5'-G GAC TTC AGG TTC TGA aTC ACT AAA TTC CTA C-3'
Position 1108 A→t	K370X-fw	5'-CC CTG AAG TCC tAG ACT CAG TGA T-3'
	K370X-rev	5'-GG GAC TTC AGG aTC TGA GTC ACT A-3'
Position 1102 A→t	K368X-fw	5'-C AAG GAG ACC CTG tAG TCC AAG ACT CAG-3'
	K368X-rev	5'-G TTC CTC TGG GAC aTC AGG TTC TGA GTC-3'
Position 1087/89 CAC→tAg	H363X-fw	5'-CTT GTG GAC CGG tAg AAG GAG ACC CTG-3'
	H363X-rev	5'-GAA CAC CTG GCC aTc TTC CTC TGG GAC-3'
Position 1084/86 CGG→tGa	R362X-fw	5'-CC CTT GTG GAC tGa CAC AAG GAG ACC-3'
	R362X-rev	5'-GG GAA CAC CTG aCt GTG TTC CTC TGG-3'
Position 1081/83 GAC→tAg	D361X-fw	5'-GGT TCC CTT GTG tAg GAC CGG CAC AAG-3'
	D361X-rev	5'-CCA AGG GAA CAC aTc GCC GTG TTC CTC-3'

Position 1078/79 GTG→ <i>taG</i>	V360X-fw	5'-GTT GGT TCC CTT taG GAC CGG CAC AAG-3'
	V360X-rev	5'-CAA CCA AGG GAA aTc CTG GCC GTG TTC-3'
Position 1075-77 CTT→ <i>taa</i>	L359X-fw	5'-G TGG GTT GGT TCC taa GTG GAC CGG CAC-3'
	L359X-rev	5'-C ACC CAA CCA AGG att CAC CTG GCC GTG-3'
Position 1073/74 TCC→ <i>Tga</i>	S358X-fw	5'-G GAG TGG GTT GGT Tga CTT GTG GAC CG-3'
	S358X-rev	5'-C CTC ACC CAA CCA Act GAA CAC CTG GC-3'
Position 1064 G→ <i>a</i>	W355X-fw	5'-A ACC GTG GAG TaG GTT GGT TCC C-3'
	W355X-rev	5'-T TGG CAC CTC AtC CAA CCA AGG G-3'
Position 1003 C→ <i>t</i>	R335X-fw	5'-AG AAG GCT CAG tGA GAT CTG GCG-3'
	R335X-rev	5'-TC TTC CGA GTC aCT CTA GAC CGC-3'

Tabelle 4: Medien, Agarplatten

LB-Medium	20g LURIA Broth Base (Invitrogen, Karlsruhe, Dtl.) 1000ml A.bidest
LB/ Antibiotikum-Medium	6ml LB-Medium 10µl Carbenicillin (50mg/ml) bzw. 10µl Kanamycin (25mg/ml)
Agarplatten	5g bacto-Tryptane (Merck, Darmstadt, Dtl.) 2.5g Hefe (Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Dtl.) 5g NaCl (Merck, Darmstadt, Dtl.) 500ml A.bidest 7,5g Bacto Agar (DiFCO Laboratories, Detroit, USA) 500µl 2M NaOH (Merck, Darmstadt, Dtl.) 45 Min. autoklavieren bei 121°C bei 45°C 25mg Antibiotikum hinzufügen nach 5 Minuten rühren und abkühlen, ausgießen in Petrischalen
NZY ⁺ -Medium	10g NZ amine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.) 5g Hefe (Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Dtl.) 5g NaCl (Merck, Darmstadt, Dtl.) 1000ml A.bidest kurz vor Gebrauch zusätzlich: 12.5ml 1M MgCl ₂ 12.5ml 1M MgSO ₄ 20ml 20%ige Glucose

Tabelle 5: Cos-7 Medien

Nährmedium	500ml 1xDMEM (Biochrom, Berlin, Dtl.) 50ml FCS (Biochrom, Berlin, Dtl.) 5ml Penicillin/Streptomycin 100U/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.) 5ml 200mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Dtl.)
Transfektionsmedium	500ml 1xDMEM 5ml L-Glutamin

Tabelle 6: Western Blot

1xTBS	8g NaCl (Merck, Darmstadt, Dtl.) 0.2g KCl (Merck, Darmstadt, Dtl.) 3.0g Trisbase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.)
Detektionspuffer	12.12g 100mM Trismabase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Dtl.) 5.84g 100mM NaCl 1000ml A.bidest Einstellung auf einen pH-Wert von 9,5

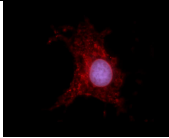
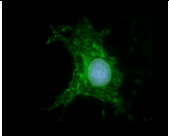
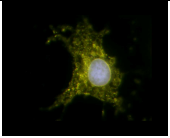
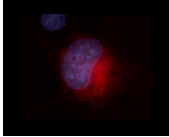
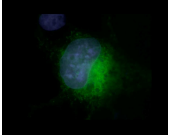
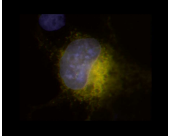
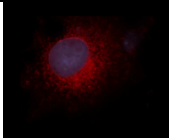
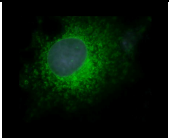
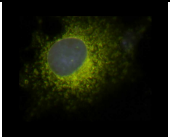
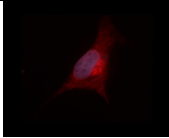
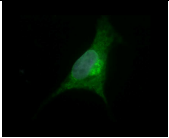
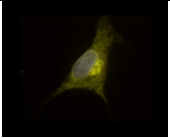
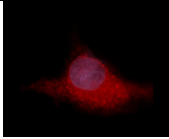
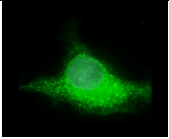
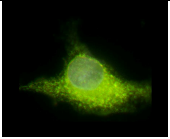
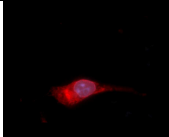
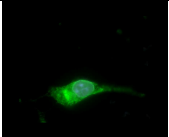
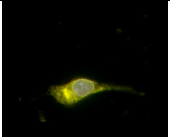
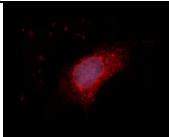
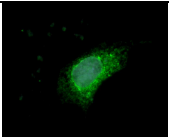
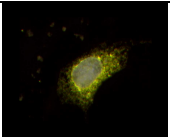
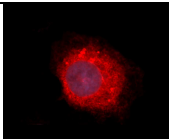
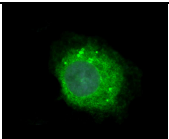
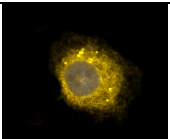
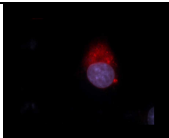
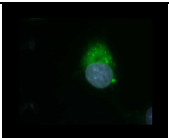
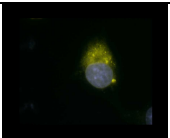
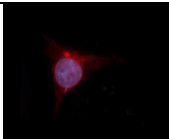
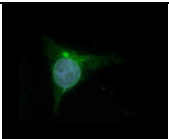
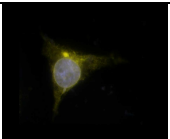
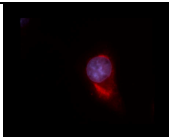
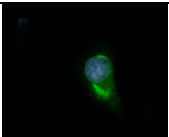
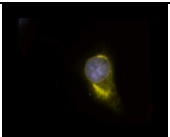
Tabelle 7: Primer für die qRT-PCR

Primer	Sequenz
HSD3B2 RT2 fw	5'-GCC TGT TGG TGG AAG AGA AG-3'
HSD3B2 RT2 rev	5'-CAG GCT CTT TTC AGG AAT GG-3'
Neomycin RT fw	5'-AGA CAA TCG GCT GCT CTG AT-3'
Neomycin RT rev	5'-CTC GTC CTG CAG TTC ATT CA-3'

Tabelle 8: K_M - und V_{max} -Werte der Mutanten

	K_M in μmol	V_{max} in pmol/well/min
WT	0.42 ± 0.05	220 ± 5.6
Q372X	0.30 ± 0.09	165 ± 18.7
K370X	0.30 ± 0.05	171 ± 6.6
K368X	0.32 ± 0.10	136 ± 18.3
H363X	0.60 ± 0.83	80 ± 42.0
R362X	0.38 ± 0.17	65 ± 4.8
D361X	0.42 ± 0.23	36 ± 7.3

Tabelle 9: Immunfluoreszenzbilder

	3 β -HSD-II	Calnexin	Kolokalisation
WT			
K370X			
K368X			
H363X			
R362X			
D361X			
V360X			
L359X			
S358X			
W355X			
R335X			

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausschnitt der Steroidhormonbiosynthese mit den durch die 3 β -HSD katalysierten Schritten	3
Abbildung 2: Enzymatische Reaktion der 3 β -HSD am Beispiel von Pregnenolon zu Progesteron	3
Abbildung 3: Klassifikation der Phänotypen bei Individuen mit 46, XY DSD nach Sinnecker; (1) männlich, gestörte Spermatogenese und/ oder gestörte Virilisierung in der Pubertät; (2) vorwiegend männlich, isolierte Hypospadie und/ oder Mikrophallus und höhergradige Hypospadie, bipartiertes Skrotum; (3) ambivalent, klitorisähnlicher Mikrophallus, labienähnliches bipartiertes Skrotum, perineoskrotale Hypospadie oder Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina; (4) vorwiegend weiblich, Klitorishypertrophie und/ oder labiale Fusion, Sinus urogenitalis mit kurzer, blind endender Vagina; (5) weiblich, keine Virilisierungszeichen präpuberal	5
Abbildung 4: Stammbaum und DNA-Sequenz des Patienten 1; Erklärung s. Text.	22
Abbildung 5: Stammbaum und Basenabfolge der Patienten 2 und 3; Erklärung s. Text.....	22
Abbildung 6: Reaktionsgeschwindigkeiten des WT, der Mutanten und des Kontrollvektors bezüglich. der Umsetzung von Pregnenolon zu Progesteron in pmol/well/min bei einer Ausgangskonzentration von 1 μ mol/l Pregnenolon; (*) bedeutet signifikant unterschiedlich im Vergleich zum WT, $p < 0.05$	23
Abbildung 7: Umsatzgeschwindigkeit von DHEA zu Androstendion des WT, der Mutanten und des Leervektors in pmol/well/min bei einer Ausgangskonzentration von 0.5 μ mol/l DHEA; (*) bedeutet signifikant unterschiedlich im Vergleich zum WT, $p < 0.05$	24
Abbildung 8: Lineweaver-Burk-Diagramme; links für den WT, Q372X, K370X und K368X; rechts für den WT, H363X, R362X und D361X; Schnittpunkt mit der x-Achse ist $-1/K_M$; y-Achsenabschnitt ist $1/V_{max}$	25
Abbildung 9: Western Blot Analyse; Erklärung s. Text.....	26
Abbildung 10: Immunfluoreszenzbilder; linke Bilderreihe Lokalisation der 3 β -HSD-II; mittlere Bilderreihe Lokalisation von Calnexin im ER; rechte Bilderreihe Co-Lokalisation der 3 β -HSD-II und des ERs.....	27
Abbildung 11: relatives Verhältnis von mRNA der 3 β -HSD-II und Neomycin für den WT, die Mutanten und den Leervektor	27
Abbildung 12: Dreidimensionale Struktur der 3 β -HSD in Beziehung zu der blau dargestellten c-terminalen α -Helix L	28
Abbildung 13: Vergrößerte räumliche Darstellung der AS (A) K370, (B) H363, (C) V360, (D) W355 und deren Interaktionspartner; Details s. Text	28
Abbildung 14: Konservierung des C-Terminus der 3 β -HSDs; die Typ I 3 β -HSD des Makaken, der Maus und der Ratte entsprechen der humanen 3 β -HSD-II; fett gedruckt sind die AS, die artifiziell gegen ein Stopp-Codon ausgetauscht wurden; grau unterlegt sind nicht übereinstimmende AS	29

10. Literaturverzeichnis

1. Thilen A, Larsson A. Congenital adrenal hyperplasia in Sweden 1969-1986. Prevalence, symptoms and age at diagnosis. *Acta Paediatr Scand*. 1990 Feb;79(2):168-75.
2. Bois E, Mornet E, Chompret A, Feingold J, Hochez J, Goulet V. [Congenital adrenal hyperplasia (21-OH) in France. Population genetics]. *Arch Fr Pediatr*. 1985 Mar;42(3):175-9.
3. Bongiovanni AM. The adrenogenital syndrome with deficiency of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Invest*. 1962 Nov;41:2086-92.
4. Zhang L, Sakkal-Alkaddour H, Chang YT, Yang X, Pang S. A new compound heterozygous frameshift mutation in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta-HSD) gene causes salt-wasting 3 beta-HSD deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Jan;81(1):291-5.
5. Welzel M, Wustemann N, Simic-Schleicher G, Dorr HG, Schulze E, Shaikh G, et al. Carboxyl-terminal mutations in 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II cause severe salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Apr;93(4):1418-25.
6. Tajima T, Fujieda K, Nakae J, Shinohara N, Yoshimoto M, Baba T, et al. Molecular analysis of type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in Japanese patients with classical 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Hum Mol Genet*. 1995 May;4(5):969-71.
7. Pang S, Wang W, Rich B, David R, Chang YT, Carbutaru G, et al. A novel nonstop mutation in the stop codon and a novel missense mutation in the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3beta-HSD) gene causing, respectively, nonclassic and classic 3beta-HSD deficiency congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2556-63.
8. Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev*. 2005 Jun;26(4):525-82.
9. Moisan AM, Ricketts ML, Tardy V, Desrochers M, Mebarki F, Chaussain JL, et al. New insight into the molecular basis of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: identification of eight mutations in the HSD3B2 gene eleven patients from seven new families and comparison of the functional properties of twenty-five mutant enzymes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Dec;84(12):4410-25.
10. Alvarez CI, Genti-Raimondi S, Patrio LC, Flury A. Topography of human placental 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4 isomerase in microsomal membrane. A study using limited proteolysis and immunoblotting. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Jul 20;1207(1):102-8.
11. Thomas JL, Nash WE, Myers RP, Crankshaw MW, Strickler RC. Affinity radiolabeling identifies peptides and amino acids associated with substrate binding in human placental 3 beta-hydroxy-delta(5)-steroid dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1993 Sep 5;268(25):18507-12.
12. Thomas JL, Evans BW, Blanco G, Mercer RW, Mason JI, Adler S, et al. Site-directed mutagenesis identifies amino acid residues associated with the dehydrogenase and isomerase activities of human type I (placental) 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998 Sep;66(5-6):327-34.
13. Thomas JL, Evans BW, Blanco G, Mason JI, Strickler RC. Creation of a fully active, cytosolic form of human type I 3beta-hydroxysteroid

dehydrogenase/isomerase by the deletion of a membrane-spanning domain. *J Mol Endocrinol.* 1999 Oct;23(2):231-9.

14. Thomas JL, Duax WL, Addlagatta A, Brandt S, Fuller RR, Norris W. Structure/function relationships responsible for coenzyme specificity and the isomerase activity of human type 1 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase. *J Biol Chem.* 2003 Sep 12;278(37):35483-90.

15. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* 2004 Dec;25(6):947-70.

16. Thomas JL, Frieden C, Nash WE, Strickler RC. An NADH-induced conformational change that mediates the sequential 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase activities is supported by affinity labeling and the time-dependent activation of isomerase. *J Biol Chem.* 1995 Sep 8;270(36):21003-8.

17. Agarwal AK, Auchus RJ. Minireview: cellular redox state regulates hydroxysteroid dehydrogenase activity and intracellular hormone potency. *Endocrinology.* 2005 Jun;146(6):2531-8.

18. Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev.* 1997 Jun;18(3):281-305.

19. Kallberg Y, Oppermann U, Jornvall H, Persson B. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Eur J Biochem.* 2002 Sep;269(18):4409-17.

20. Morrison N, Nickson DA, McBride MW, Mueller UW, Boyd E, Sutcliffe RG. Regional chromosomal assignment of human 3-beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase to 1p13.1 by non-isotopic in situ hybridisation. *Hum Genet.* 1991 Jun;87(2):223-5.

21. Berube D, Luu The V, Lachance Y, Gagne R, Labrie F. Assignment of the human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (HSDB3) to the p13 band of chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet.* 1989;52(3-4):199-200.

22. Rheume E, Lachance Y, Zhao HF, Breton N, Dumont M, de Launoit Y, et al. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol.* 1991 Aug;5(8):1147-57.

23. Lachance Y, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Dumont M, de Launoit Y, et al. Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1990 Nov 25;265(33):20469-75.

24. Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, Belanger A, Labrie F. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads. *J Endocrinol.* 2001 Nov;171(2):373-83.

25. Labrie F, Simard J, Luu-The V, Pelletier G, Belghmi K, Belanger A. Structure, regulation and role of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase enzymes in the formation of sex steroids in classical and peripheral intracrine tissues. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1994 Apr;8(2):451-74.

26. Goto M, Piper Hanley K, Marcos J, Wood PJ, Wright S, Postle AD, et al. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):953-60.

27. Simard J, Moisan AM, Morel Y. Congenital adrenal hyperplasia due to 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta(5)-Delta(4) isomerase deficiency. *Semin Reprod Med.* 2002 Aug;20(3):255-76.

28. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*. 2006 Aug;118(2):e488-500.
29. Sinnecker GH, Hiort O, Dibbelt L, Albers N, Dorr HG, Hauss H, et al. Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Am J Med Genet*. 1996 May 3;63(1):223-30.
30. Simard J, Rheume E, Mebarki F, Sanchez R, New MI, Morel Y, et al. Molecular basis of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995 Jun;53(1-6):127-38.
31. White PC. Disorders of aldosterone biosynthesis and action. *N Engl J Med*. 1994 Jul 28;331(4):250-8.
32. New MI, White PC. Genetic disorders of steroid hormone synthesis and metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1995 Jul;9(3):525-54.
33. Siegenthaler W, Blum HE. *Klinische Pathophysiologie*. Thieme Verlag; 2006.
34. Riepe FG, Mahler P, Sippell WG, Partsch CJ. Longitudinal study of plasma pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in full-term and preterm neonates at birth and during the early neonatal period. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Sep;87(9):4301-6.
35. de Peretti E, Forest MG. Pitfalls in the etiological diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the early neonatal period. *Horm Res*. 1982;16(1):10-22.
36. Sinnecker GHG. Intersexualität. *Gynäkologe*. 2004;37:799-805.
37. Chang YT, Kappy MS, Iwamoto K, Wang J, Yang X, Pang S. Mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a patient with classic salt-wasting 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Res*. 1993 Nov;34(5):698-700.
38. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
39. Allard ST, Cleland WW, Holden HM. High resolution X-ray structure of dTDP-glucose 4,6-dehydratase from *Streptomyces venezuelae*. *J Biol Chem*. 2004 Jan 16;279(3):2211-20.
40. Vriend G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph*. 1990 Mar;8(1):52-6, 29.
41. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997 Dec;18(15):2714-23.
42. Morel Y, Mebarki F, Rheume E, Sanchez R, Forest MG, Simard J. Structure-function relationships of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: contribution made by the molecular genetics of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Steroids*. 1997 Jan;62(1):176-84.
43. Simard J, Rheume E, Leblanc JF, Wallis SC, Joplin GF, Gilbey S, et al. Congenital adrenal hyperplasia caused by a novel homozygous frameshift mutation 273 delta AA in type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (HSD3B2) in three male patients of Afghan/Pakistani origin. *Hum Mol Genet*. 1994 Feb;3(2):327-30.
44. Alos N, Moisan AM, Ward L, Desrochers M, Legault L, Leboeuf G, et al. A novel A10E homozygous mutation in the HSD3B2 gene causing severe salt-wasting 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in 46,XX and 46,XY French-Canadians: evaluation of gonadal function after puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 May;85(5):1968-74.
45. Thomas JL, Boswell EL, Scaccia LA, Pletnev V, Umland TC. Identification of key amino acids responsible for the substantially higher affinities of human type 1

3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase (3beta-HSD1) for substrates, coenzymes, and inhibitors relative to human 3beta-HSD2. *J Biol Chem.* 2005 Jun 3;280(22):21321-8.

46. Thomas JL, Mason JI, Brandt S, Spencer BR, Jr., Norris W. Structure/function relationships responsible for the kinetic differences between human type 1 and type 2 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and for the catalysis of the type 1 activity. *J Biol Chem.* 2002 Nov 8;277(45):42795-801.

47. Rheume E, Sanchez R, Mebarki F, Gagnon E, Carel JC, Chaussain JL, et al. Identification and characterization of the G15D mutation found in a male patient with 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta-HSD) deficiency: alteration of the putative NAD-binding domain of type II 3 beta-HSD. *Biochemistry.* 1995 Mar 7;34(9):2893-900.

48. Katsumata N, Tanae A, Yasunaga T, Horikawa R, Tanaka T, Hibi I. A novel missense mutation in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a family with classical salt-wasting congenital adrenal hyperplasia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *Hum Mol Genet.* 1995 Apr;4(4):745-6.

49. Rheume E, Simard J, Morel Y, Mebarki F, Zachmann M, Forest MG, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Nat Genet.* 1992 Jul;1(4):239-45.

50. Marui S, Torrealba IM, Russell AJ, Latronico AC, Sutcliffe RG, Mendonca BB. A novel homozygous nonsense mutations E135* in the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a girl with salt-losing congenital adrenal hyperplasia. *Mutations in brief no. 168. Online. Hum Mutat.* 1998;12(2):139.

51. Zhang L, Mason JI, Naiki Y, Copeland KC, Castro-Magana M, Gordon-Walker TT, et al. Characterization of two novel homozygous missense mutations involving codon 6 and 259 of type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3betaHSD) gene causing, respectively, nonsalt-wasting and salt-wasting 3betaHSD deficiency disorder. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Apr;85(4):1678-85.

52. Thomas JL, Mason JI, Blanco G, Veisaga ML. The engineered, cytosolic form of human type I 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase: purification, characterization and crystallization. *J Mol Endocrinol.* 2001 Aug;27(1):77-83.

53. Persson B, Krook M, Jornvall H. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur J Biochem.* 1991 Sep 1;200(2):537-43.

54. Gendrel D, Chaussain JL, Roger M, Job JC. [Congenital adrenal hyperplasia due to blockade of 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase]. *Arch Fr Pediatr.* 1979 Jul-Aug;36(7):647-55.

11. Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. F.G. Riepe für die Themenstellung und für seine überaus gewissenhafte Betreuung während der gesamten Dauer meiner Dissertation. Er war jederzeit für anfallende Probleme erreichbar und konnte immer mit konstruktiven Lösungsvorschlägen weiterhelfen.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben auch Tanja Dahm und die anderen Mitarbeiter des pädiatrisch-endokrinologischen Labors wesentlich beigetragen. Für deren sachkundige Einführung in die Labortechnik und große Hilfsbereitschaft ich mich herzlich bedanken möchte. Ich habe die angenehme Arbeitsatmosphäre sehr geschätzt.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. J. Grötzinger und Herrn M. Michalek aus dem biochemischen Institut für die Erstellung des 3D-Modells bedanken. Die Betrachtung des Modells und die Diskussionen haben erheblich zum Verständnis des Themas beigetragen.

Vielen Dank sage ich auch an meine Eltern, die mich auf ihre liebevolle Art und Weise immer unterstützen und mir das Studium ermöglichen.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nele Wüstemann

Anschrift: Dammstr. 44a
24103 Kiel

Geburtsdatum und -ort: 10.04.1983 in Kiel

Familienstand: ledig

Eltern: Wiebke Wüstemann, geb. Nissen
Dr. med. Michael Wüstemann

Schulbildung

1989-1994 Grundschule Dänischenhagen

1994-2003 Gymnasium Altenholz-Stift, Abschluss Abitur (1,8)

2000-2001 Toms River High School, New Jersey, USA

Hochschulausbildung

2003-2005 Vorklinisches Studium an der Universität zu Hamburg

09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2,0)

2005- *dato* Klinischer Studienabschnitt an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

10/2006 Aufnahme der Promotion bei PD Dr. F. G. Riepe an der Universitätsklinik Kiel im Themenbereich der molekularbiologischen Endokrinologie

08/2008- *dato* Beginn des praktischen Jahres, Wahlfach Pädiatrie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Publikationen

Welzel M, Wüstemann N, Šimić-Schleicher G, Dörr HG, Schulze E, Shaikh G, Clayton P, Grötzinger J, Holterhus PM, Riepe FG (2008) Carboxyterminal mutations in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II cause severe salt-wasting congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 93:1418-1424